



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## STUDIUM INTERAKCÍ HYALURONANU A BIOKOMPATIBILNÍCH AMFIFILNÍCH LÁTEK

STUDY OF THE INTERACTION OF HYALURONAN AND BIOCOMPATIBLE AMPHIPHILIC  
SUBSTANCES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

HANA BARBOŘÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0923/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Hana Barboříková</b>	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Filip Mravec, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Jana Szewieczková	

### Název bakalářské práce:

Studium interakcí hyaluronanu a biokompatibilních amfifilních látek

### Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o interakci hyaluronanu se směsí fosfolipidu a tenzidu.
2. Na základě rešerše vybrat fosfolipidy a vhodné tenzidy využitelné k podpoře interakcí mezi fosfolipidem a hyaluronanem.
3. Vybrat vhodnou metodu, navrhnout a provést základní experimenty agregace vybraných fosfolipidů a tenzidů v přítomnosti fosfolipidů a studovat vliv hyaluronanu na tento komplex.
4. Zhodnotit výsledky z hlediska využití takovýchto komplexů v kosmetice a farmacii.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Hana Barboříková  
Student(ka)

-----  
Ing. Filip Mravec, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato práce je zaměřena na studium interakcí hyaluronanu s vybranými lipidy a jejich směsmi ve vodě nebo v pufru. Nejprve bylo proměřeno agregační chování samotných lipidů a poté bylo zjištěno jeho ovlivnění přidavkem hyaluronanu. Toto chování bylo sledováno pomocí fluorescenční spektroskopie, za využití pyrenu jako fluorescenční sondy. Byly stanoveny kritické agregační koncentrace studovaných systémů před a po přidání hyaluronanu. Bylo zjištěno, že přidavek hyaluronanu má ve všech systémech vliv na agregační chování lipidů a jejich směsí.

## **ABSTRACT**

This thesis focuses on the study of the interactions between hyaluronan and selected phospholipids and their mixtures in water or buffer. First, the aggregation behavior of these lipids was measured, afterwards the influence of hyaluronan was studied. This behavior was investigated by fluorescence spectroscopy using pyrene as fluorescence probe. The Critical Agregation Concentration of the lipids before and after addition of hyaluronan was determined. The measurements revealed that the addition of hyaluronan has an observable influence on the aggregate behavior of the selected lipids and their mixtures.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

lipid, fosfolipid, hyaluronan, fluorescence, pyren

## **KEY WORDS**

lipid, phospholipid, hyaluronan, fluorescence, pyrene

BARBOŘÍKOVÁ, H. *Studium interakcí hyaluronanu a biokompatibilních amfifilních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 41 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomhle místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce Ing. Filipovi Mravcovi, PhD. za cenné připomínky a rady během zpracování této práce, dále své konzultantce Ing. Janě Szewieczkové za odborný dohled, vstřícnost a pomoc při řešení problémů. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přátelům za podporu při studiu a pomoc při psaní bakalářské práce.

## **OBSAH**

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Amfifilní látky	7
2.1.1 Fosfolipidy	8
2.1.2 Packing parametr	9
2.1.3 Liposomy	10
2.2 Kyselina hyaluronová	10
2.2.1 Struktura	10
2.2.2 Uspořádání v roztoku	11
2.2.3 Využití v kosmetice	12
2.3 Fluorescence	12
2.3.1 Instrumentace	14
2.3.2 Pyren	15
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	17
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1 Chemikálie	20
4.2 Metody	21
4.2.1 Příprava zásobních lipidů	21
4.2.2 Příprava zásobních roztoků kyseliny hyaluronové a pufru	21
4.2.3 Příprava vzorků	21
4.2.4 Měření a zpracování výsledků	22
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	24
5.1 Interakce směsí DPPC a DPTAP	24
5.2 Studium interakcí v přítomnosti hyaluronanu	26
5.3 Stanovení CAC DPPE a jeho směsí	30
5.4 Interakce DPPE a jeho směsí	30
5.6 Studium interakcí DPPE a jeho směsí po předání HyA	32
6. ZÁVĚR	37
7. POUŽITÁ LITERATURA	38
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	41

## 1. ÚVOD

Kyselina hyaluronová je díky svým unikátním schopnostem už několik let využívána v lékařství a kosmetice. Nejdříve se s ní léčili popáleniny, kožní vředy, byla využívána jako přísada do očních kapek a roztoků na kontaktní čočky. Kromě farmaceutického průmyslu má v posledních letech široké využití v kosmetickém průmyslu, kde se používá jako přísada v přípravcích proti stárnutí pleti, v sérech na vlasy a nehty.

Kombinací hydratačních účinků kyseliny hyaluronové a fosfolipidových liposomů by mohl vzniknout přípravek, který bude dobře hydratovat, nedráždit a vyživovat pokožku. Jelikož lipidy jsou přirozenou součástí všech vrstev pokožky (vrstvy rohové, zrnité, ostnitě), jsou do nich schopné pronikat. Díky tomu, že jsou kyselina hyaluronová a fosfolipidy biokompatibilní a lidskému tělu jsou vlastní, tak by neměli způsobit žádné podráždění pokožky.

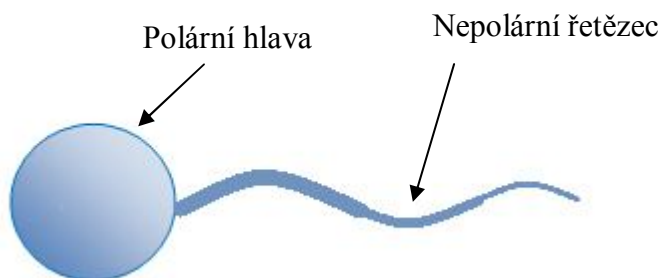
Tato práce je zaměřena na studium agregačního chování systému amfifilní látka-hyaluronan ve vodě a v pufru. Ze skupiny fosfolipidů byly vybrány 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-fosfocholin a 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-fosfoetanolamin, také byl vybrán dipalmitoyl trimetylamonium propan, který neobsahuje fosfátovou skupinu. Byly připraveny směsi DPPC/DPTAP v pufru a DPPE/DPPC ve vodě v různých poměrech.

U všech směsí byla pomocí fluorescenční spektroskopie stanovena kritická agregační koncentrace jich samotných, dále k nim byl přidán hyaluronan a byla studována změna v agregačním chování.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

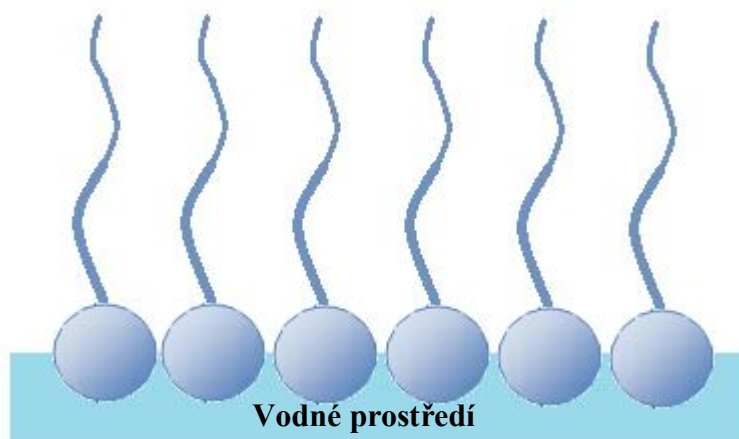
### 2.1 Amfifilní látky

Amfifilní molekuly jsou složeny z hydrofilní a hydrofobní části (**Obrázek 1****Obrázek 1**). Část hydrofilní je reprezentována polární skupinou (polární hlava). Tato část se může být tvořena například aminovou nebo sulfátovou skupinou či cukernými kruhy. Hydrofobní část (hydrofobní konec) se skládá z uhlovodíkového řetězce.

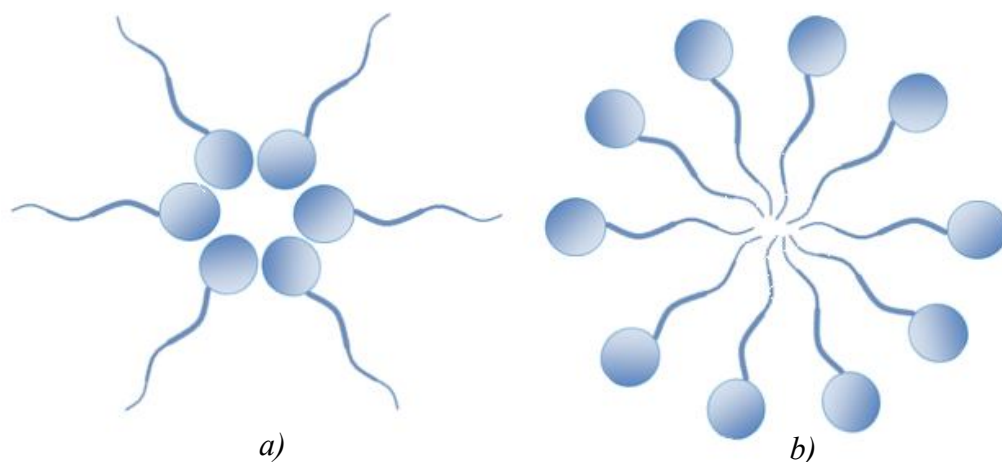


**Obrázek 1:** *Struktura amfifilní látky*

V polárním rozpouštědle amfifilní molekuly automaticky zaujmají takovou polohu, aby nepolární konec nebyl vystaven polárnímu rozpouštědлу. Nejdříve se nasytí povrch kapaliny (**Obrázek 2**), se vzrůstající koncentrací amfifilní látky se začnou tvořit micely (**Obrázek 3**). V nepolárním rozpouštědle budou vznikat obrácené micely [1]. Koncentrace, při které dojde k nasycení povrchu kapaliny molekulami, a začnou se tvořit micely, se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC). Vzniklé micely mohou mít různý tvar (kulovitý, zploštěný nebo elipsoidní) [2]. Fyzikální vlastnosti micel závisí na strukturní organizaci řetězců amfifilních molekul, jenž je tvoří [3].



**Obrázek 2:** *Hladina rozpouštědla nasycená amfifilními molekulami*

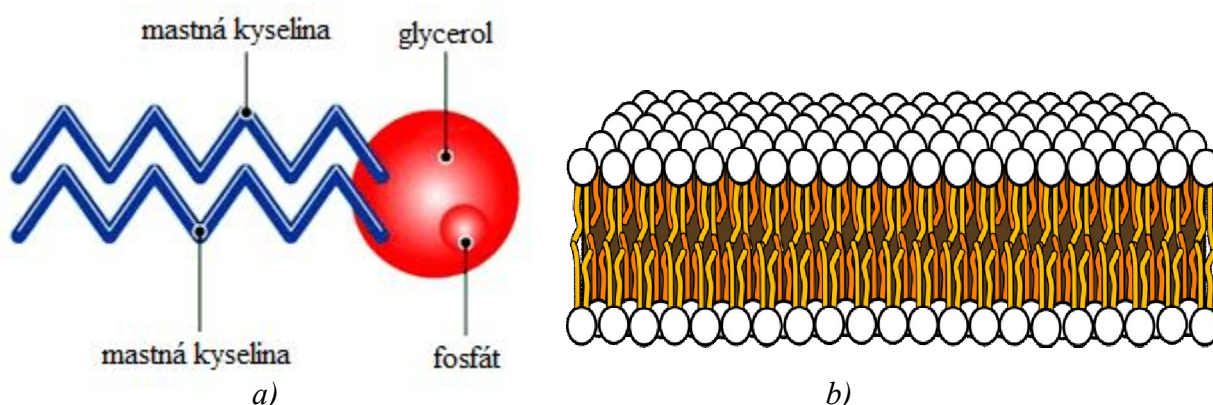


**Obrázek 3:** a) struktura micely v nepolárním prostředí, b) struktura micely v polárním rozpouštědle

Tyto molekuly mají v přírodě široké zastoupení. Mezi jejich zástupce patří lipidy buněčných membrán a řada bílkovin, jejichž funkce je na rozhraní mezi lipidovou a vodnou fází [4].

### 2.1.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy (**Obrázek 4**) patří do skupiny tuků. Jsou odvozeny od glycerolu. Jejich amfifilní strukturu tvoří uhlíkové zbytky mastných kyselin (nepolární část), fosfátová skupina a další polární skupiny, jako například cholin, ethanolamin, glycerol, serin (polární část). Molekuly fosfolipidů se ve vodném prostředí chovají jako amfifilní látky, jejich nepolární část není v kontaktu s rozpouštědlem. Při nižších koncentracích ( $10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>) fosfolipidu vznikají micely a pokud je koncentrace fosfolipidů dosti vysoká seskupí se molekuly do dvojvrstvy. Právě tato jejich vlastnost je odlišuje od ostatních amfifilních látek, které při vysokých koncentracích tvoří micely. Jsou hlavní složkou buněčných membrán.



**Obrázek 4:** Struktura: a) fosfolipidu [5], b) fosfolipidové dvojvrstvy [6]

DPPC (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-fosfocholin) je jedním z nejhojnějších fosfolipidů, nejčastěji se vyskytuje v buněčné membráně a plazmě. Díky válcovému tvaru molekuly se spontánně organizuje do dvojvrstvy a slouží jako strukturní prvek buněčných membrán. Patří mezi zwitteriony (ve své molekule obsahuje kladný i záporný náboj, přičemž celkový náboj je neutrální) a jeho polární část tvoří cholin [7].



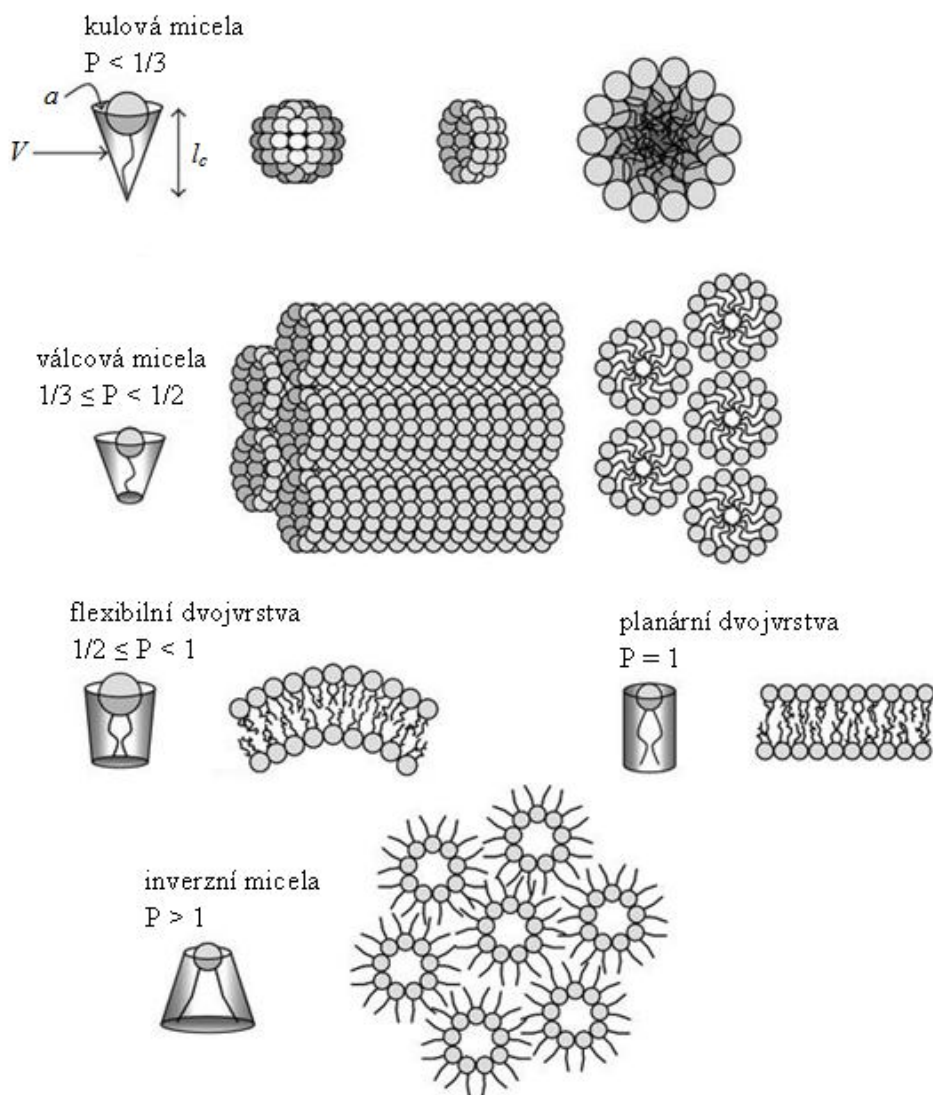
DPPE (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-fosfoetanolamin) se také, poměrně ve velkém množství, vyskytuje v buněčné membráně a patří mezi zwitteriony. Má menší čelní skupinu, takže molekula má spíše tvar kužele, díky tomu může na ionizovatelnou aminoskupinu přes vodíkový můstek navázat protein [8].

### 2.1.2 Packing parametr

Amfifilní molekuly spolu agregují a tvoří různé mikrostruktury (**Obrázek 5**). Každá struktura je vytvářena pomocí vlastností konkrétních amfifilních molekul, které ji tvoří tak, aby byla energeticky nejvýhodnější. Packing parametr, který předpovídá toho uspořádání, lze vypočítat pomocí rovnice:

$$P = \frac{V}{a \cdot l_c}$$

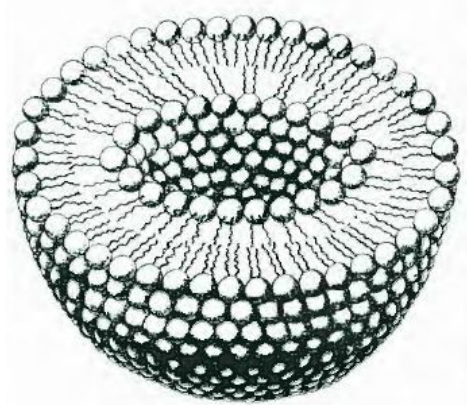
kde  $V$  je objem hydrofobní části,  $a$  je plocha polární hlavy lipidu a  $l_c$  je délka lipidového řetězce. Vzorec je možné aplikovat i na směs lipidů, kde se bere v úvahu poměr lipidů ve směsi [9].



**Obrázek 5:** Tvar vzniklých agregátů v závislosti na hodnotě packing parametru [9]

### 2.1.3 Liposomy

Liposomy (**Obrázek 6**) jsou sférické struktury, které vznikají dispergací lipidového filmu ve vodě. Jejich povrch tvoří jedna nebo více lipidových dvojvrstev uzavírající část disperzního prostředí. Pro jejich tvorbu mohou být použity různé amfifilní molekuly a způsob jejich přípravy se uzpůsobuje požadované velikosti a morfologii. Jelikož liposom obsahuje jak hydrofilní tak hydrofobní prostředí, může enkapsulovat hydrofilní i hydrofobní látky. Hydrofilní látky budou rozpuštěny ve vodném roztoku, který se nachází uvnitř liposomu, zatímco hydrofobní látky, které nemohou interagovat s vodným roztokem, jsou uloženy uvnitř lipidové dvojvrstvy. Při kontaktu s buňkou může dojít k fúzi membrán a přenášené látky se uvolní do intracelulární tekutiny. Díky tomuto mechanismu mohou přes membránu buněk pronikat látky, které za normální okolností buněčnou stěnou neprošly [10].



**Obrázek 6:** *Struktura liposomu [10]*

## 2.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová byla poprvé připravena v první polovině 19. století. Ovšem popsána byla až v roce 1934 Karlem Mayerem a Johnem Palmerem, kteří ji izolovali z očního sklivce hovězího dobytka. Tato kyselina obsahovala uronovou kyselinu, proto byl název vytvořen složením slov hyalos (což znamená sklovitý) a uronová kyselina [11].

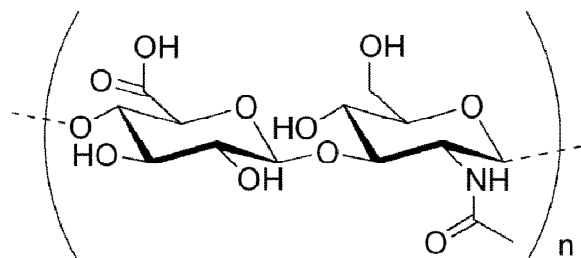
První lékařská aplikace hyaluronanu na člověka byla v roce 1950 při operaci oka. Toho roku byla také teprve popsána jeho chemická struktura.

Její funkcí v těle je vázání vody a snížení tření u pohyblivých částí těla, jako jsou klouby a svaly. Díky její konzistenci, schopnosti hydratace a přívětivosti ke tkáním je často využívána jako přísada do různých produktů pečujících o pokožku [12].

### 2.2.1 Struktura

Kyselina hyaluronová je lineární polysacharid, který se skládá z opakujících se jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetylglukosaminu (**Obrázek 7**). Tyto jednotky jsou spojeny  $\beta$ -1,4 a  $\beta$ -1,3 glykosidickou vazbou. Oba cukry jsou prostorově podobné glukose. Počet opakujících se disacharidů v molekule kyseliny hyaluronové může dosáhnout 10 000 a více. Takže její molekulová hmotnost může dosáhnout přibližně 4 milionů g/mol (každý disacharid má přibližně 400 g/mol). Délka řetězce pak může dosahovat až 10  $\mu$ m [12].

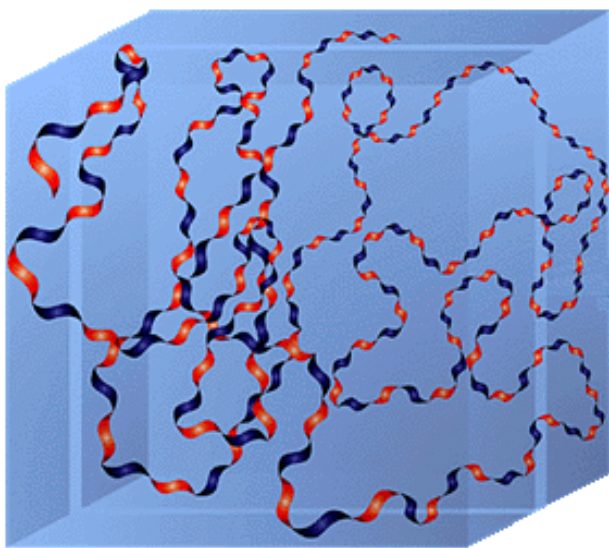
Přírodně se vyskytuje jako součást buněk (extracelulární matrix). U člověka se vyskytuje v kůži, oku a synoviální tekutině. V těle je odbourávána enzym hyaluronidázou a v místě zánětu reaktivními kyslíkatými meziprodukty [13]. V těle se vyskytuje ve formě sodné soli, která dostala označení hyaluronan (HyA)



**Obrázek 7:** *Struktura kyseliny hyaluronové*

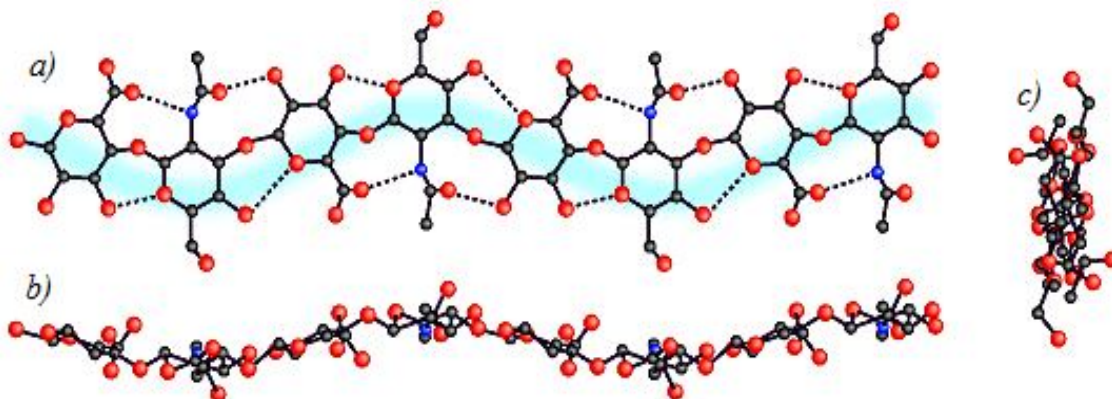
### 2.2.2 Uspořádání v roztoku

Ve fyziologickém roztoku je páteř molekuly hyaluronanu vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Polárnější část tvoří ekvatoriální skupiny a axiální nepolární část je tvořena atomy vodíku. Díky tomu se struktura kyseliny hyaluronové v roztoku podobá zkrouceným pásům (**Obrázek 8**). Karboxylové a acetamidové postranní skupiny leží v těsné blízkosti u sebe na obou stranách glykosidické vazby. Při tvorbě soli se každý disacharid natočí tak, aby se na něj mohl navázat co největší kation. Tato rotace je přesně  $120^\circ$ , což je pravděpodobně důvodem hexagonálního uspořádání sousedních řetězců. Některé modelové stavební studie naznačují, že levotočivá šroubovice je příznivější formou, jelikož jsou karboxylové s aminoacetalové skupiny stočené od sebe, takže poskytují větší prostor pro vazbu kationtu. U pravotočivé šroubovice jsou tyto mezery menší [14]. Roztoky hyaluronanu projevují velmi neobvyklé reologické vlastnosti a jsou velmi hydrofilní [12].



**Obrázek 8:** *Struktura hyaluronanu v roztoku [15]*

Řetězec hyaluronanu obsahuje dva typy vazeb. První jsou vazby v sacharidových jednotkách, díky kterým si tyto jednotky drží poměrně stálý tvar. Druhým typem jsou glykosidické vazby mezi jednotkami. Ty tvoří atom kyslíku, jenž spojuje jednotlivé cukry. Tyto atomy kyslíku přispívají dvěma vazbami, které jsou orientovány tak, že svými rameny tvoří písmeno V. Díky možné otáčivosti substituentů připojených na koncích ramen poskytuje glykosidický můstek několik možných konfigurací. Obrovské množství tvarů jedné molekuly, získáme vynásobením možných konfigurací počtem můstků v dlouhém řetězci [16].



**Obrázek 9:** Počítačové modulace struktury hyaluronanu v roztoku: a) průmět, b) pohled podél osy dvojnásobné spirály, c) prostorová projekce [16]

### 2.2.3 Využití v kosmetice

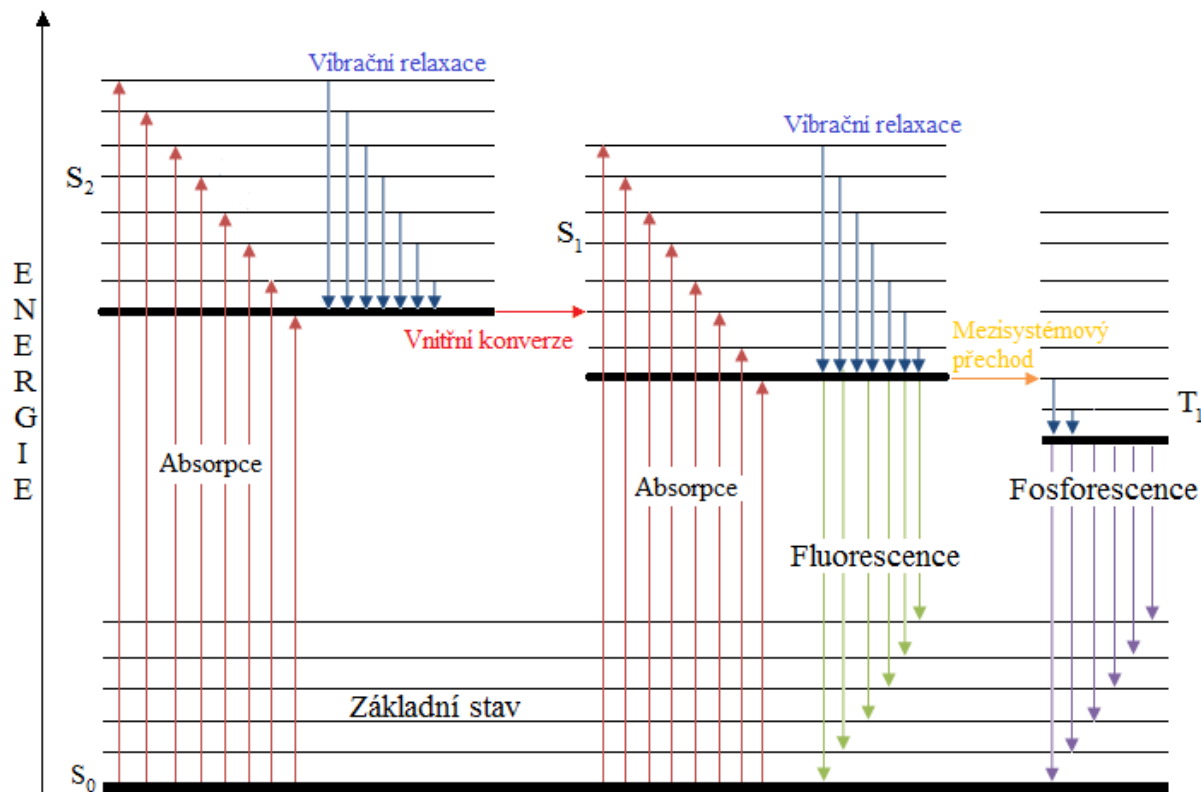
Kyselina hyaluronová je díky svým viskoelastickým vlastnostem a biokompatibilitě v kosmetice velmi využívána. Často se vyskytuje v krémech, sérech, šampónech, kondicionérech, ale prodává se také ve formě tobolek. Kosmetické výrobky, které ji obsahují, kůži hydratují, obnovují její pružnost, a tím, že pohlcuje volné radikály chrání kůži před UV zářením. Díky těmto vlastnostem jsou výrobky, které kyselinu hyaluronovou obsahují označeny jako výrobky zpomalující příznaky stárnutí (tvorbu vrásek). Různými pokusy bylo dokázáno, že při jejich používání skutečně dochází k hydrataci a omlazení pleti.

Také se testovalo možné využití kyseliny hyaluronové v plastické chirurgii, jako náhrady za silikonové implantáty. Bylo zjištěno, že struktura orgánu je vizuálně lepší a navíc ani po roce implantace nebyly zjištěny žádné vedlejší účinky [17].

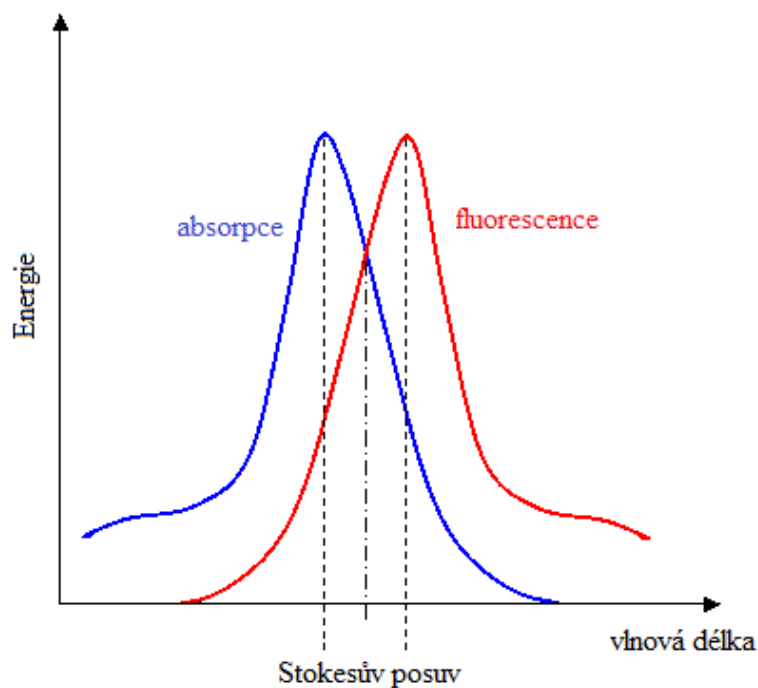
## 2.3 Fluorescence

Fluorescence se fyzikálně chemický děj, který patří do skupiny luminiscence. Molekuly se přirozeně vyskytují v základním energetickém stavu, to znamená, že mají elektrony lokalizované na hladině  $S_0$  s nejnižší možnou energií. Tento stav se velmi stabilní. Při pohlcení kvanta světla je elektronům dodána energie, což vede k přechodu do excitovaného stavu. Jsou známy dva typy excitovaných stavů, stav singletový ( $S_x$ ) a stav tripletový ( $T_x$ ). Excitovaný stav je nestabilní a elektrony se snaží nově nabitou energii zbavit, aby dosáhly opět stabilního základního stavu. Jedním ze způsobů odbourávání energie je zářivá deaktivace – fluorescence a fosforescence. Při fluorescenci dojde k přechodu elektronu ze singletového stavu do stavu  $S_0$ . Tento přechod trvá přibližně  $10^{-9}$  až  $10^{-6}$  s. Druhým typem zářivé

deaktivace je fosforescence, kdy se elektron dostává z tripletového stavu do stavu  $S_0$ . Jelikož při fosforescenci dochází ke změně spinu, trvá tento děj déle ( $10^{-4}$  až  $10^2$  s). Dalším způsobem deaktivace jsou tzv. nežářivé přechody – vibrační relaxace, vnitřní konverze a mezisystémový přechod. Všechny jednotlivé přechody znázorňuje Jabloňského diagram (Obrázek 10).



Obrázek 10: Jabloňského diagram



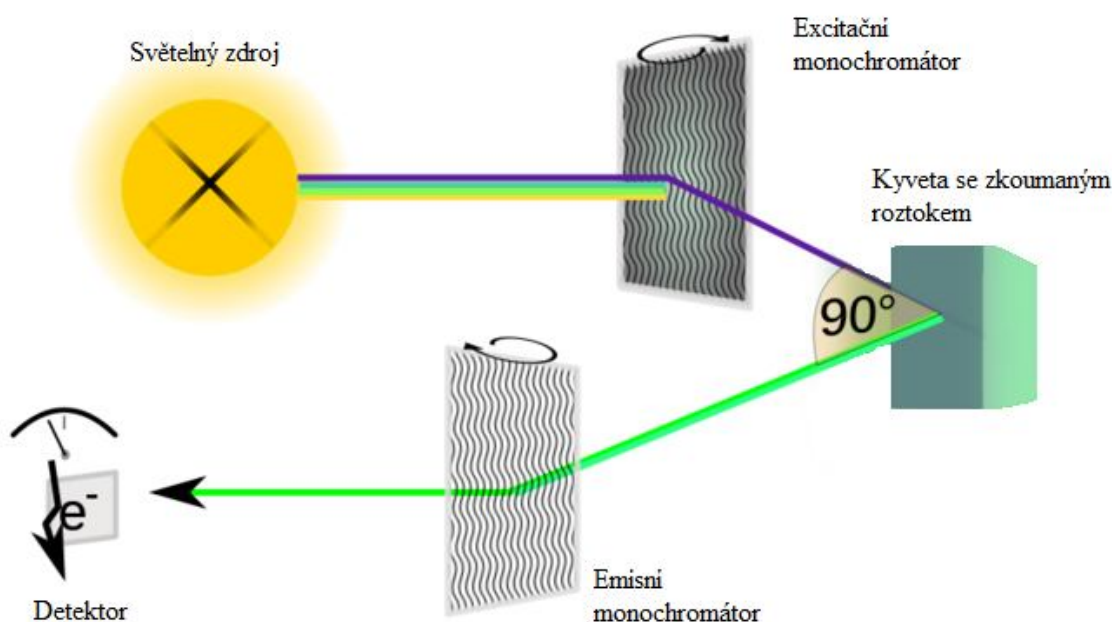
Obrázek 11: Stokesův posuv [18]



Energie, kterou molekuly vyzáří, je menší než ta, kterou absorbuje, jelikož se část energie spotřebuje při vibrační relaxaci a isoenergetických přechodech. Díky ztrátě této energie dojde, u fluorescenčního spektra k posuvu k vyšším vlnovým délkám proti tomu absorpčnímu spektru. U velkého množství organických molekul jsou spektra téměř zrcadlově symetrická. Tento posuv se nazývá Stokesův posuv (**Obrázek 11**) a lze ho vyjádřit jako rozdíl mezi maximy emisního a absorpčního spektra.

### 2.3.1 Instrumentace

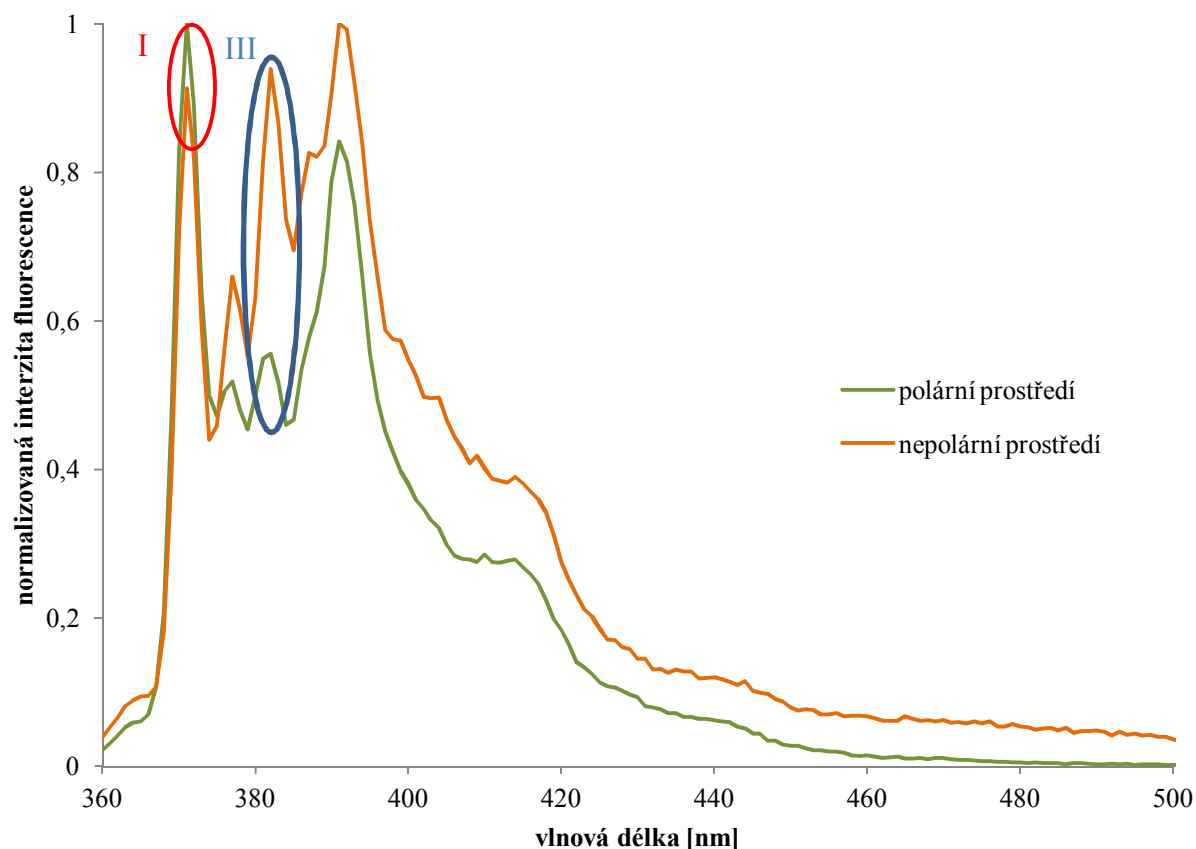
Měření fluorescence probíhá pomocí fluorescenčního spektrometru, který měří intenzitu emitovaného světla (**Obrázek 12**). Skládá z několika hlavních částí – zdroje světla, excitačního monochromátoru, měřící cely, emisního monochromátoru a detektoru [19]. Jako zdroje světla se nejčastěji používají výbojky s dutou katodou. Pro viditelnou a infračervenou oblast se využívá halogenová žárovka, deuteriová a vodíková výbojka je zdrojem pro ultrafialové záření. Budící světlo prochází excitačním monochromátorem, kde se vybere určitá vlnová délka, dopadá na vzorek (kyveta s roztokem). Pro viditelnou oblast se používají skleněné kyvety, pro ultrafialovou se využívají křemenné kyvety. Poté část emitovaného světla putuje do emisního monochromátoru, kde se vybere určitá vlnová délka, která dopadá na detektor [20]. Uspořádání fluorescenčního spektrometru je pravoúhlé, aby nedocházelo k ovlivnění intenzity emisního monochromátoru zdrojem světla. Při měření emisních fluorescenčních spekter je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Když se měří excitační spektra, tak je na pevnou vlnovou délku nastaven emisní monochromátor. Kromě vlnových délek se nastavují také šířky štěrbin monochromátoru, což ovlivňuje množství světla dopadajícího na detektor. Fluorescenční spektrometr musí být propojen s počítačem, který má nainstalovaný vhodný program pro vyhodnocování jednotlivých spekter.



**Obrázek 12:** Schéma fluorescenčního spektrometru

### 2.3.2 Pyren

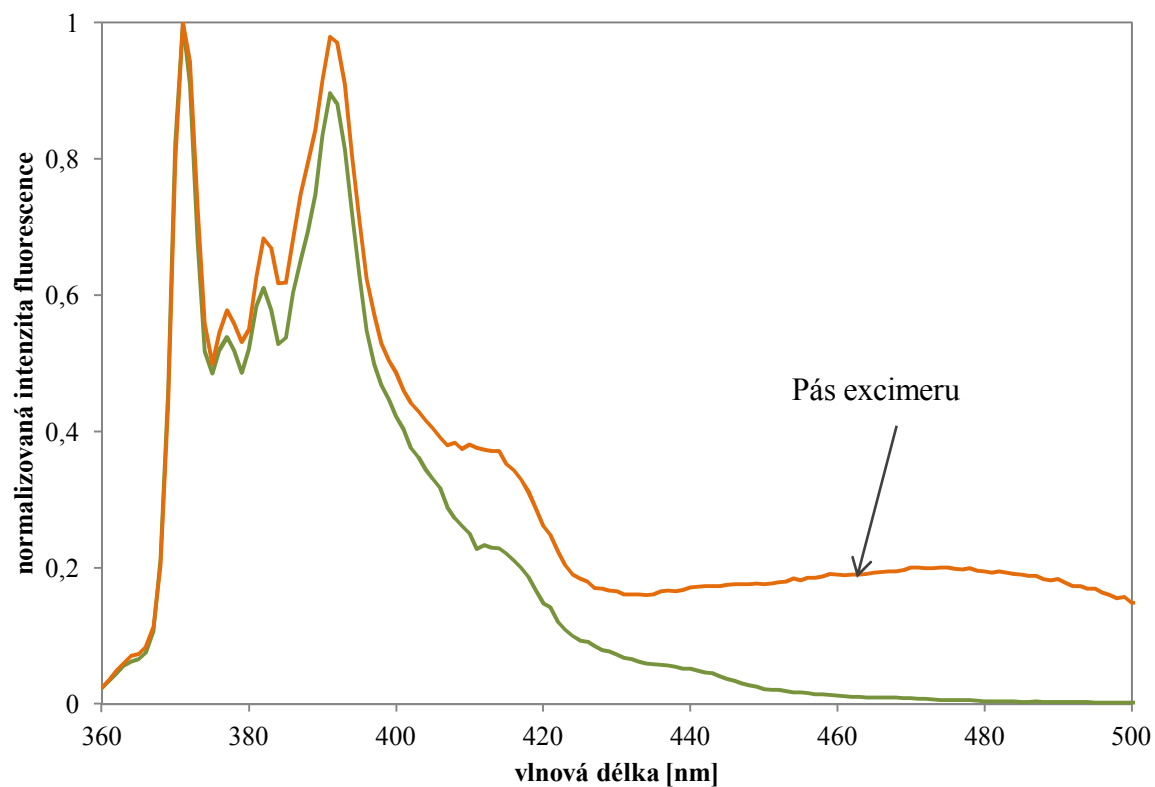
Pyren je polycyklický aromatický uhlovodík. V současné době patří mezi nejvíce využívané sondy pro studium hydrofobních oblastí. Využívá se jeho citlivost na polaritu prostředí (**Obrázek 13**).



**Obrázek 13:** Emisní spektrum pyrenu v polárním a nepolárním prostředí

Při vyhodnocování se využívají jeho hodnoty emisního (EmPI) a excitačního (ExPI) polaritního indexu. Emisní spektrum pyrenu tvoří 5 maxim, která přísluší jednotlivým vibračním přechodům. Důležité jsou především hodnoty intenzity prvního a třetího vibračního pásu. Hodnota intenzity prvního vibračního pásu se nachází přibližně u vlnové délky 373 nm, jedná se o vibrační zářivý přechod 0–0. Kolem vlnové délky 383 nm se nachází hodnota intenzity třetího vibračního pásu, který odpovídá přechodu 0–2. Poměr intenzit těchto dvou pásů se označuje jako emisní polaritní index [21]. Tento index udává informace o polaritě prostředí, v polárním prostředí je hodnota indexu přibližně 1,7 a v nepolárním prostředí je to okolo hodnoty 0,5.

Dále se zjišťuje intenzita fluorescence při 470 nm, která odpovídá typickému maximu pro excimer. Excimer vzniká kolem kritické micelární koncentrace (když se molekuly pyrenu zkoncentrují uvnitř micel) a tehdy je hodnota intenzity fluorescence pásu excimeru nejvyšší. Po překročení kritické micelární koncentrace následuje maximum excimeru a poté tato hodnota klesá, jelikož se snižuje pravděpodobnost vzniku excimeru (dochází ke vzniku více micel a pyren je mezi ně rovnoměrněji rozdělen) (**Obrázek 14**) [21].



**Obrázek 14:** Znáznornění pásu excimeru v emisním spektru pyrenu

Pro získání excitačního polaritního indexu se využívá poměru fluorescence získaného z excitačního spektra při vlnových délkách 333 nm a 338 nm. Hodnota excitačního polaritního indexu je opět pro polární prostředí větší než pro prostředí nepocholární.



### 3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Výzkum **Forseye a kol.** byl zaměřen na studium schopností směsi HyA s DPPC a samotného DPPC snížit počáteční tření na modelu poškozené lidské chrupavky. Bylo totiž zjištěno, že k největšímu tření dochází na začátku pohybu, který následuje po dlouhodobém zatížení. Za použití fluorescenčně značené HyA byl zkoumán rozsah pronikání HyA do lidské chrupavky [22].

Nejdříve byl studován vliv samotného DPPC a samotné HyA. Pokusy bylo zjištěno, že požití HyA a DPPC na poškozenou lidskou chrupavku vede ke zlepšení lubrikace mezi jejími povrchy. Účinnost HyA není závislá na její koncentraci, ovšem na lubrikační schopnosti DPPC už koncentrace vliv má. Směs HyA a DPPC vykazoval zvýšenou lubrikační schopnost a také lepší ochranu chrupavkové tkáně. Příčina těchto vlivů není ještě zcela objasněna, ale některé studie naznačují, že lipid je při lubrikaci chrupavky důležitý a zvýrazňují jeho potenciál, jakožto přísady do terapeutických mastí s obsahem HyA [22].

Rozsah pronikání fluorescenčně značené HyA byl až 300  $\mu\text{m}$  pod povrch chrupavky. Pronikla přes povrch chrupavky, ale pouze její část se dostala do vrstev chrupavky, kde se zaměřila na chondrocyty, které se nacházely v povrchových a středních zónách. Interakcemi HyA a chondrocyty může být stimulována syntéza nových molekul HyA a také se sníží produkce protizánětlivých mediátorů. Tento rozsah penetrace HyA do chrupavky a její reakce s chondrocyty potvrdila dlouhodobé terapeutické účinky HyA [22].

**Min Wang a kol.** se zabývali schopností HyA a DPPC lubrikovat vrstvy povrchu chrupavky. Zkoumali interakce mezi hyaluronanem a sdružení malých váčků DPPC, možnost vytváření komplexní vrstvy DPPC a hyaluronanu. Mazací schopnost těchto vrstev byla zjišťována pomocí koloidní sondy [23].

Snažili se objasnit mechanismus toho efektu, který v práci **Forseye a kol.** nebyl zcela vysvětlen. Jako jeden ze způsobů byla navržena spontánní interakce hyaluronanu a fosfolipidu ze synoviální tekutiny v organizovaných vrstvených strukturách. Metodou dynamického rozptylu světla, použitou při zkoumání malých sdružených váčků DPPC a hyaluronanu bylo zjištěno, že dochází k adsorpci hyaluronanu na povrch váčku. Samotné váčky DPPC mají střední hydrodynamický průměr 110 nm, po interakci s hyaluronanem se zvýšil na 140 nm. Zkoumala se možnost vytvoření komplexních vrstev DPPC a hyaluronanu na povrchu oxidu křemičitého a jejich schopnost snížit tření ve vodném prostředí. Na povrch oxidu křemičitého adsorbovalo pouze DPPC, na které se později adsorboval hyaluronan. Bylo zjištěno, že samotné DPPC i DPPC po adsorpci hyaluronanu snižuje tření [23].

Role hyaluronanu v plicních sklípcích se zabývali **Bray a spol.** Epiteliální buňky II typu, které se nachází ve stěně plicních sklípků, se specializují na produkci surfaktantu a také vylučují hyaluronan do vodné subfáze. Hyaluronan se v extracelulární hmotě váže na buněčné proteiny a povrchové receptory. Na koncentraci hyaluronanu a jeho molekulové hmotnosti závisí vlastnosti hydrofilních gelů. Tyto gely jsou tvořeny sítí z agregovaného hyaluronanu s proteiny nebo bez proteinů. Hyaluronan také interaguje s fosfolipidy a má hydrofobní oblasti, které by se mohly vázat k hydrofobním povrchově aktivním proteinům B a C. Podle primární hypotézy je hyaluronan přítomen ve vodné subfázi plicních sklípků, a jeho funkcí je zde tvořit hydrofilní gel pomocí agregace a specifické interakce s proteiny. Koncentrace hyaluronanu a ostatních proteinů je největší na buněčné stěně, což naznačuje, že tady bude gel

nejvíce strukturovaný. Na rozhraní gel-vzduch bude především voda, která je v gelu přítomná a na níž se mohou být rozšířit povrchově aktivní lipidy. Aby se vytvořila povrchově aktivní vrstva, je nezbytná přímá interakce HyA s povrchově aktivním lipidem [23].

Sekundární teorie tvrdí, že molekuly vody jsou pomocí vodíkových můstků vázány k HyA s určitou pravidelností podél řetězce. Tyto hydrofilní oblasti na molekule HyA přitáhnou polární část fosfolipidu (nabitě polární části fosfolipidu interagují s HyA tak, že kvartérní aminoskupina DPPC je přitahována ke karboxylové skupině HyA a tím se umožní mnoho možných vazebných míst), tím se fosfolipidy orientují podél HyA. Tato teorie přímé interakce mezi HyA a fosfolipidem zvyšuje stabilitu povrchově aktivní vrstvy [24].

Cílem práce **Arpicco S. a kol.** byla příprava směsí DPPE a HyA dvou různých molekulových hmotností (4 800 Da a 12 000 Da). Během jejich přípravy do nich byl zaváděn C12GEM (lipofilní léčivo). Byl studován zeta potenciál a pomocí TEM analýzy se zkoumaly rozdíly mezi liposomy s HyA a bez ní [25].

Výsledky ukazují, že liposomy obsahující HyA by mohly fungovat jako nosiče cílené na GEM protilátky. Dále bylo zjištěno, že HyA (12 000 Da) má větší afinitu k CD44 receptorům než HyA 4 800. Také byla prozkoumána cytotoxicita těchto látek, aby se ověřila jejich bezpečnost pro běžné užívání, čímž bylo zjištěno, že C12GEM zvyšuje cytotoxickou aktivitu a že směs liposomů s HyA více inhibuje růst buněk [25].

Využití skupiny fosfolipidů, jako možných nosičových systémů pozitivních při léčbě revmatoidní artritidy studovali **Jolanda M. van den Hoven a spol.** Použití liposomů jako nosičů léčiv může zvýšit terapeutický index používaných antirevmatik. Díky fyzikálně-chemickým vlastnostem fosfolipidů dokážou léčiva lépe pronikat přes biologické bariéry a zadržet se v místě podání, a také zabraňují předčasné degradaci a toxicitě pro necílené tkáně. Mezi zkoumanými fosfolipidy byly DPPE i DPPC [26].

Z výsledků výzkumu lze usoudit, že velkou výhodou liposomů je jejich pružnost, pokud se jedná o složení, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a schopnost pojmout široké spektrum molekul léků a také následné pomalé uvolňování léku [26].

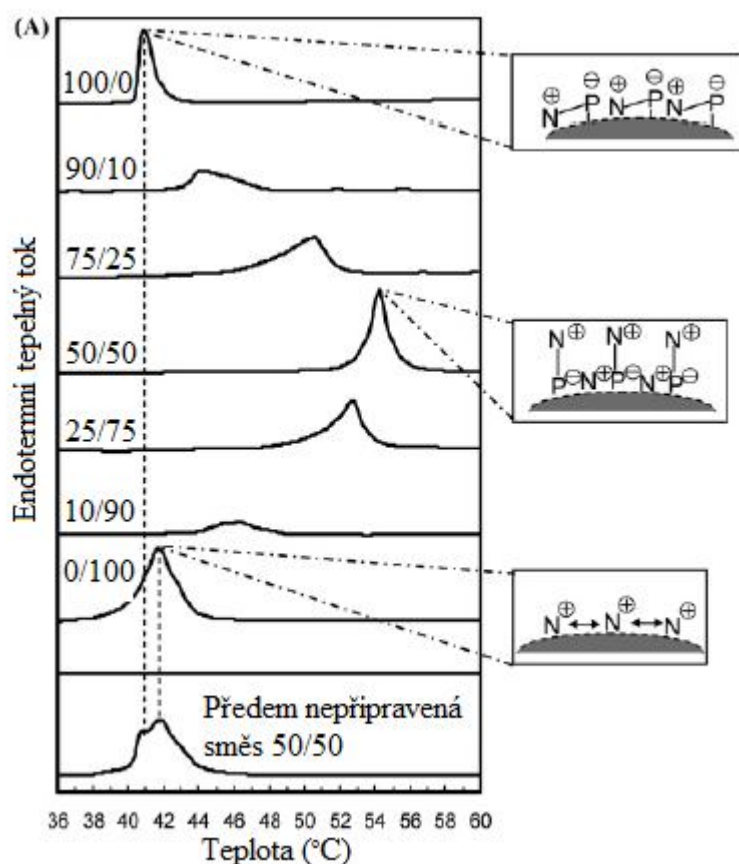
**Peer Dan a kol.** testovali, zda hyaluronan působí na směsi DPPC a DPPE kryoprotektivně. Směsi byly smíchány s hyaluronanem o různých koncentracích (0,5; 2 a 5 mg/ml) a byly u nich měřeny strukturální vlastnosti, jako velikost částic a zeta potenciál, před a po lyofilizaci. Bylo zjištěno, že po lyofilizaci se částice zvětší a dochází i ke zvýšení jejich zeta potenciálů. Ovšem tyto změny, jsou mnohem menší, než jaké nastaly u liposomů bez hyaluronanu, čímž se potvrdila kryoprotektivita hyaluronanu [27].

**Gzyl-Malcher B. a spol.** zkoumali interakce smíšených monovrstev lipidů DPPC a DPTAP s fytohormony kyseliny indol-3-octové a selenanovými anionty ve vodě. Izotermy povrchového napětí byly naměřeny v závislosti na průměrném obsahu plochy. Hlavní uspořádání bylo zkoumáno pomocí mikroskopie Brewsterova úhlu (BAM) a pomocí X-ray difrakce (GIDX) byla zkoumána organizace lipidových molekul v kondenzovaných monovrstvách. Směs DPTAP a DPPC byla použita, aby napodobila membránové domény s rozdílnými elektrickými náboji [28].

Výsledky měření závislosti povrchového napětí na průměrném obsahu molekuly a rozptylu RTG záření ukazují, že při použití směsi DPTAP a DPPC dochází k výraznému zhušťujícímu efektu u monovrstev lipidů oproti samotným DPTAP nebo DPPC. Ionty selenanu přispívají

k jednovrstvé kondenzaci a neutralizují kladný náboj. Molekuly kyseliny indol-3-octové pronikají lipidy monovrstvy a způsobují její expanzi [28].

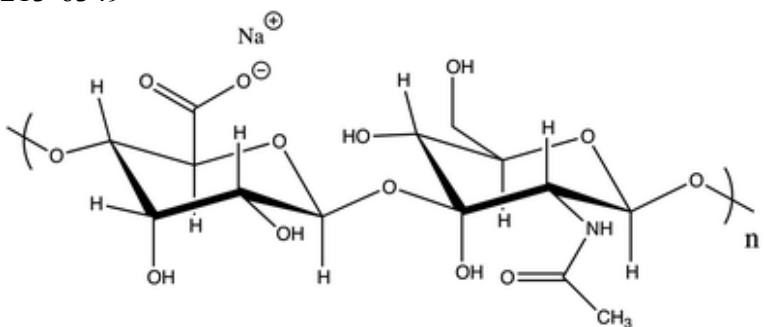
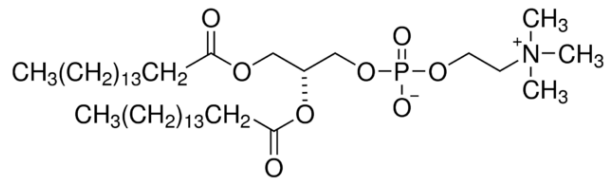
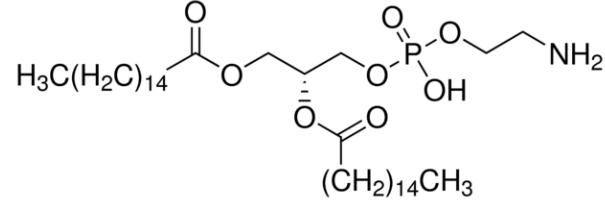
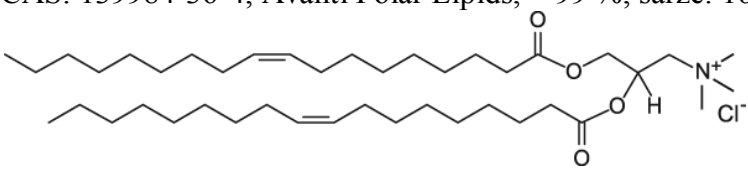
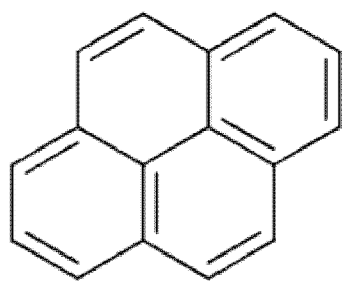
Adsorpci lipidů na kulovitých polymerech studovali **Troutier a kol.** Jako polymer byly vybrány polystyrenové částice s negativním nábojem, na jejich povrchy se adsorbovali DPPC a DPTAP. Z DSC křivek různých směsí vezikul DPPC/DPTAP (**Obrázek 15**) ve vodě vyplývá, že pro čisté DPPC závislost tepelného toku na teplotě vykazuje úzký entalpický přechod. Pro čistý DPTAP byl pík poměrně široký, což bylo zdůvodněno tím, že se DPTAP i přes vysokou koncentraci seskupuje nejen do multilamelárních struktur, ale i do monolamelárních, které poskytují širší píky. Jelikož se kladně nabitě polární hlavy DPTAP ve vodě elektrostaticky odpuzují, je překrývání dvojvrstev DPTAP složitější. Po přidavku 10 nebo 25 molárních procent DPTAP k DPPC došlo k posunutí píku k vyšším teplotám a jeho rošíření. U směsi DPPC/DPTAP v poměru 50/50 byla získána nejvyšší teplota a také velmi úzký pík. S nárůstem podílu DPTAP ve směsi byly píky opět širší a objevovaly se při nižších teplotách, než tomu bylo u směsi DPPC/DPTAP v poměru 50/50 [29].



**Obrázek 15:** DSC křivky jednotlivých lipidů a jejich směsí [29]

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Chemikálie

<p>Polyaniont</p>	<p>Kyselina hyaluronová, sodná sůl (HyA) 341 kDa, CPN spol. s.r.o, šarže: 213-6349</p> 
<p>Fosfolipid</p>	<p>DPPC, 1,2-dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-fosfocholin, CAS: 63-89-8, Avanti Polar Lipids, &gt; 99 %, šarže: 160PC-315</p> 
	<p>DPPE, 1,2-dipalmitoyl-<i>sn</i>-glycero-3-fosfoethanolamin, CAS: 923-61-5, Sigma-Aldrich, ≥ 97 %, šarže: 078K5203</p> 
	<p>DPTAP, 1,2-dipalmitoyl-3-trimethylamonium-propan (chloridová sůl), CAS: 139984-36-4, Avanti Polar Lipids, &gt; 99 %, šarže: 160TAP-28</p> 
<p>Fluorescenční sonda</p>	<p>pyren, CAS: 1299-00-0, Fluka, puriss. p. a. for fluorescence, šarže: 430166/1</p> 

Rozpouštědla	superčistá voda (upravená systémem PURELAB flex) Chloroform, CAS: 67–66–3, Sigma-Aldrich, for UV-spectroscopy, šarže: PP/2008/05926/0 Methanol, CAS: 67-56-1, Sigma-Aldrich, ACS spectrophotometric grade, ≥99,9 %, MDL číslo: MFCD00004595 Aceton, CAS: 67-64-1, Lach-Ner, šarže: PP/2013/03951
Ostatní	Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a., CAS: 13472-35-0, Lach-Ner, šarže: 304660306 Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a., CAS: 10039-32-4, Lach-Ner, šarže: PP/2009/06156

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Příprava zásobních lipidů

#### 4.2.1.1 Zásobní roztoky DPPE a DPPC

Zásobní roztoky DPPE a DPPC byly připraveny rozpuštěním příslušných množství lipidů v požadovaném poměru ve směsi chloroformu a metanolu (v objemovém poměru 65:35). Následně byla směs rozpouštědel odpařena na vakuové rotační odparce při teplotě přibližně 40 °C. Vzniklý lipidový film byl rozpuštěn ve 30 ml superčisté vody a za postupné zahřívání na teplotu přibližně 70 °C sonifikován pomocí ultrazvukové sondy zhruba 30–45 minut.

#### 4.2.1.2 Zásobní roztoky DPTAP a DPPC

Do vialky bylo naváženo potřebné množství DPTAP a DPPC v požadovaném poměru a toto množství bylo rozpuštěno v 1 ml chloroformu, který byl za sníženého tlaku odpařen. Poté byl do vialky napipetován příslušný objem fosfátového pufru. Roztok byl sonifikován pomocí ultrazvukové sondy přibližně 10–15 minut.

### 4.2.2 Příprava zásobních roztoků hyaluronanu a pufru

Zásobní roztoky hyaluronanu byly připraveny rozpuštěním navážky HyA jejím rozmícháním v malém množství vody (popřípadě pufru) na magnetické míchačce. Po úplném rozpuštění HyA byl roztok doplněn vodou anebo pufrem na přesný objem, aby měl požadovanou koncentraci (0,9 g/l).

Zásobní roztok pufru byl připraven navážením požadovaného množství dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného a dodekahydrátu hydrogenfosforrečnanu disodného. Látky byly rozpuštěny v 1 dm<sup>3</sup> vody, tak aby se dosáhlo požadovaného pH.

### 4.2.3 Příprava vzorků

Byly připraveny 3 shodné koncentrační řady obsahující 15–20 vzorků se vzrůstající koncentrací lipidů. Do vialek bylo pipetováno takové množství zásobního roztoku pyrenu v acetonu, aby výsledná koncentrace pyrenu ve vzorcích byla řádově 10<sup>-6</sup> M. Aceton byl

následně odpařen za sníženého tlaku. Poté bylo do vialky pipetováno příslušné množství daného zásobního roztoku lipidu (HyA byl přidán až po proměření agregačního chování samotných lipidů) a nakonec byly vzorky doplněny vodou nebo pufrům na celkový objem 3 ml. Vzorky byly ponechány na třepačce při laboratorní teplotě po dobu 17–24 hodin.

#### 4.2.4 Měření a zpracování výsledků

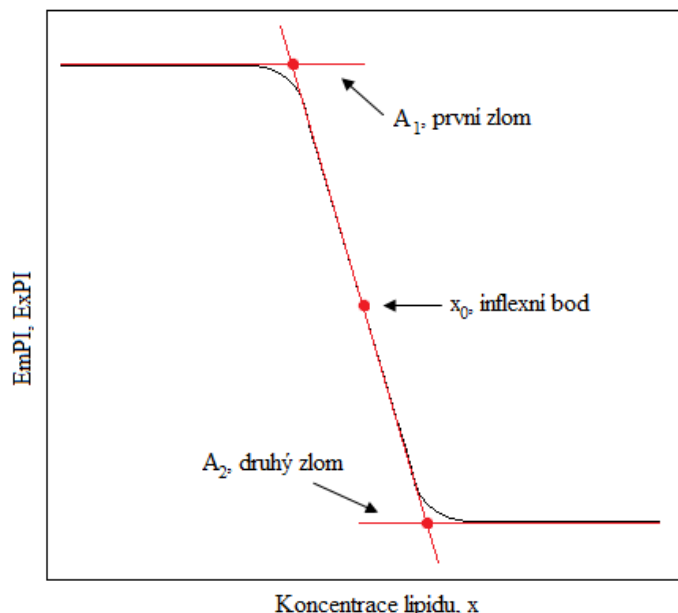
Excitační a emisní fluorescenční spektra byly proměřeny pomocí přístroje Fluorolog. Excitační sken byl měřen v rozsahu 320–340 nm s emisní vlnovou délkou 392 nm, emisní v rozsahu 360–510 nm s excitační vlnovou délkou 335 nm. Z emisního skenu byla zaznamenávána intenzita fluorescence prvního (373 nm) a třetího (383 nm) vibračního pásu a intenzita pásu excimeru (při 470 nm). Emisní polaritní index (EmPI) byl získán podělením intenzit fluorescence prvního a třetího pásu. Hodnoty Ex:Mo získány podělením intenzit fluorescence pásu excimeru a monomeru (první vibrační pás). Z excitačního skenu byl získán excitační polaritní index (ExPI) podělením intenzit fluorescence při 333 nm a 338 nm.

Do grafu byly vyneseny závislosti EmPI a ExPI na koncentraci lipidů v logaritmickém měřítku. Získaná závislost má charakter S-křivky a byla proložena v programu Origin Boltzmannovou závislostí (**Obrázek 16**).

Rovnice Boltzmannovy závislosti:

$$EmPI, ExPI = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x-x_0)}{dx}}} + A_2$$

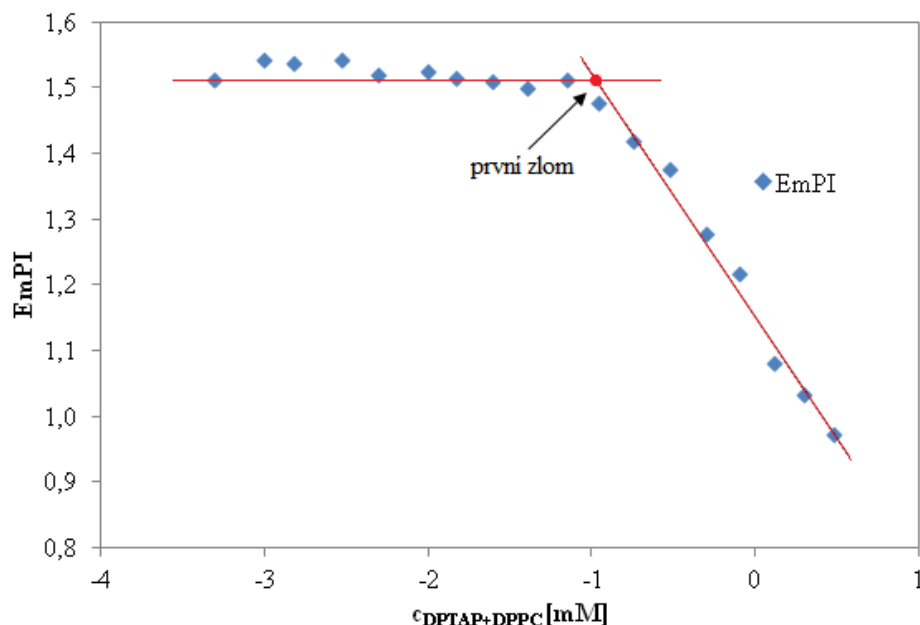
kde  $A_1/A_2$  je y-ová souřadnice prvního/druhého zlomu,  $x$  je nezávisle proměnná,  $x_0$  je hodnota nezávisle proměnné v inflexním bodu a  $dx$  je gradient.



**Obrázek 16:** Znáznornění Boltzmannovy závislosti

U směsi DPTAP a DPPC, při většině měření, neměla závislost emisního a excitačního polaritního indexu na koncentraci směsi lipidů charakteristický sigmoidní tvar Boltzmannovy křivky, jelikož nebylo možné doměřit druhé rameno Boltzmannovy závislosti, a to díky

posunu CAC (kritické agregační koncentrace) k vyšším koncentracím. Ovšem díky omezené rozpustnosti lipidů nebylo možné namíchat vzorky s takovou koncentrací, aby bylo druhé rameno Boltzmannovy závislosti doměřeno. Proto nebyla pro tyto systémy vypočítaná CAC jako souřadnice inflexních bodů, ale proložením závislosti dvěma přímkami byla získána koncentrace prvního zlomu závislosti  $E_{mPI}$  ( $ExPI$ ) na logaritmu koncentrace, jejíž hodnota odpovídá počátku agregace (**Obrázek 17**). Měření bylo vždy prováděno třikrát, naměřená data byla zprůměrována.

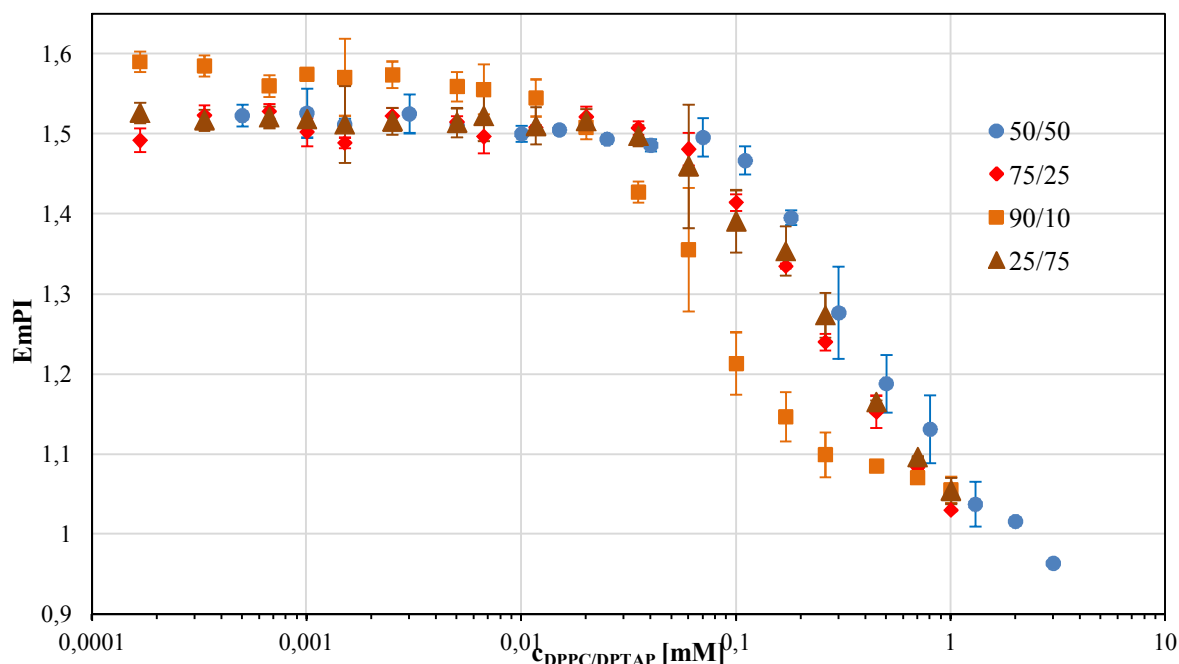


**Obrázek 17:** Znáznornění prvního zlomu závislosti  $E_{mPI}$  na logaritmu koncentrace směsi lipidů DPPC/DPTAP

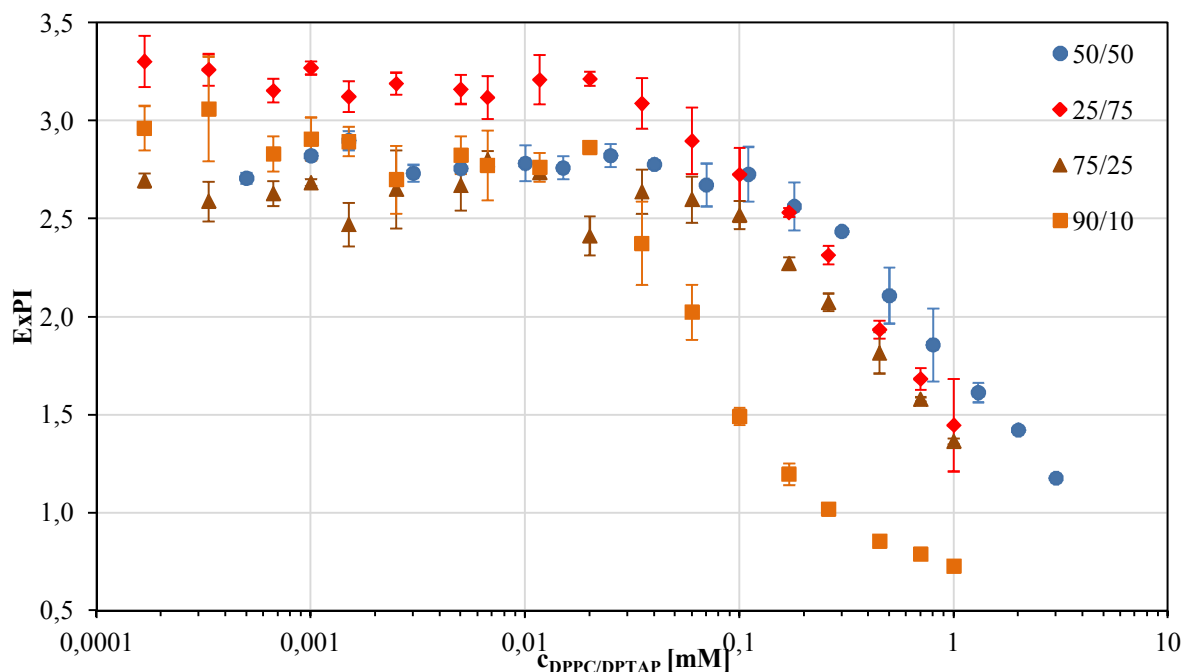
## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Interakce směsí DPPC a DPTAP

V této části byl zkoumán vliv poměru směsi lipidů na agregační chování, namícháním 3 řad roztoků vzorků se vzrůstající koncentrací směsi lipidů v pufru. Byly studovány směsi DPPC/DPTAP v poměru 25/75, 50/50, 75/25, 90/10. U směsí byly sledovány emisní i excitační polaritní indexy a jejich závislost na koncentraci a také byl vypočítány poměry Ex:Mo.



**Obrázek 18:** Znáznornění závislosti  $EmPI$  na koncentraci směsi lipidů DPPC/DPTAP v různých poměrech



**Obrázek 19:** Závislost  $ExPI$  na koncentraci směsi lipidů DPPC/DPTAP v různých poměrech



Na **Obrázku 18** jsou zobrazeny závislosti EmPI na koncentraci směsi lipidů DPTAP a DPPC v pufru v různých poměrech. U těchto závislostí většinou nebyla doměřená celá Boltzmannova křivka, takže nebylo možné pro výpočet CAC použít matematické vyjádření Boltzmannovy závislosti. Proto byly tyto závislosti proloženy dvěma přímkami, jak je uvedeno v kapitole **4.2.4 Měření a zpracování výsledků**, a byla vypočítána koncentrace při prvním zlomu, které odpovídá přibližně koncentraci v počátku agregace (CPA). U poměru 90/10 byla naměřena kompletní Boltzmannova závislost. Hodnoty CPA jsou uvedeny v **Tabulce 1**.

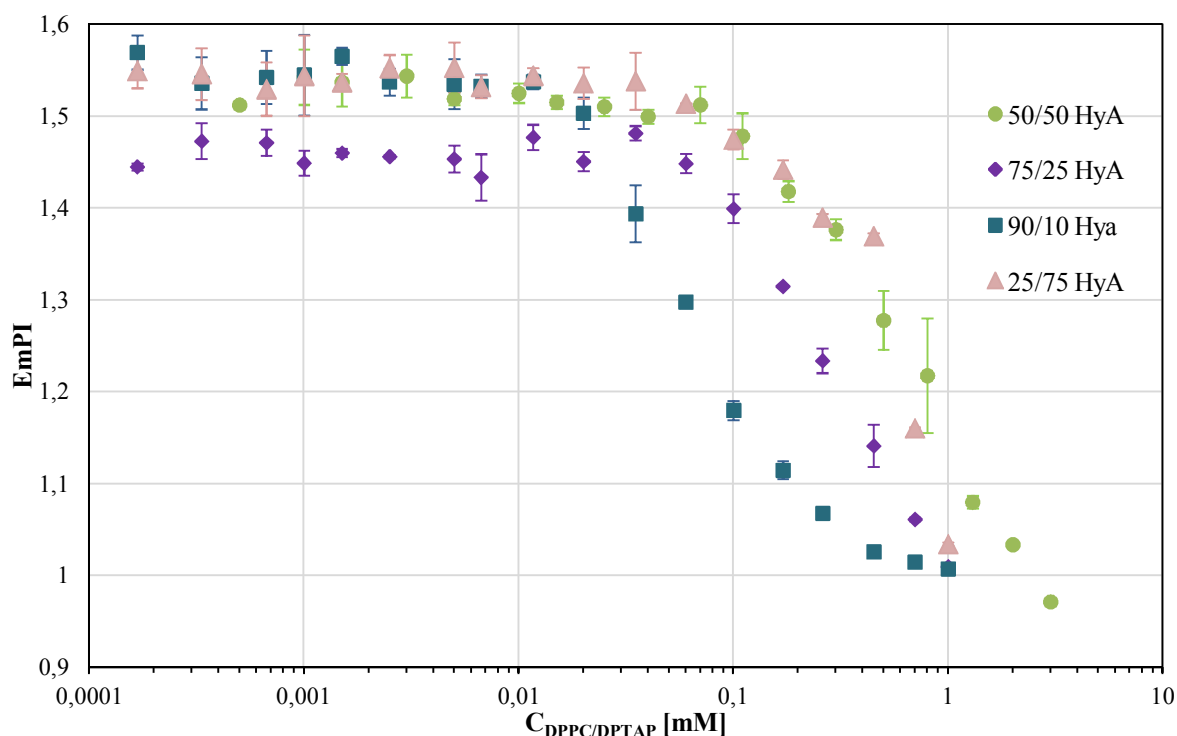
**Obrázek 19** vyobrazuje závislost ExPI na koncentraci lipidů v daných poměrech. Stejně jako v případě EmPI byly CPA vypočítány jako průsečík dvou přímek. U poměru DPPC/DPTAP 90/10 se vyskytuje charakteristický tvar Boltzmannovi křivky.

**Tabulka 1: Naměřené hodnoty CPA**

DPPC/DPTAP	CPA [ $\mu\text{M}$ ]	závislost	
		EmPI	ExPI
25/75	1. řada	60,3	33,81
	2. řada	56,3	33,16
	3. řada	-	-
	<b>průměr</b>	<b>58,3</b>	<b>33,5</b>
	odchylka	2,0	0,3
50/50	1. řada	104,5	176,1
	2. řada	104,4	157,5
	3. řada	109,3	114,2
	<b>průměr</b>	<b>106,1</b>	<b>149,2</b>
	odchylka	2,3	25,9
75/25	1. řada	50,7	80,5
	2. řada	52,7	74,9
	3. řada	60,8	66,9
	<b>průměr</b>	<b>54,7</b>	<b>74,1</b>
	odchylka	4,3	5,6
90/10	1. řada	14,5	67,3
	2. řada	14,7	58,9
	3. řada	12,9	78,7
	<b>průměr</b>	<b>14,1</b>	<b>68,3</b>
	odchylka	0,8	8,1

## 5.2 Studium interakcí směsí DPPC a DPTAP v přítomnosti hyaluronanu

Po proměření agregačního chování samotných směsí byly vzorky proměřeny po přidání HyA o koncentraci 15 mg/l.

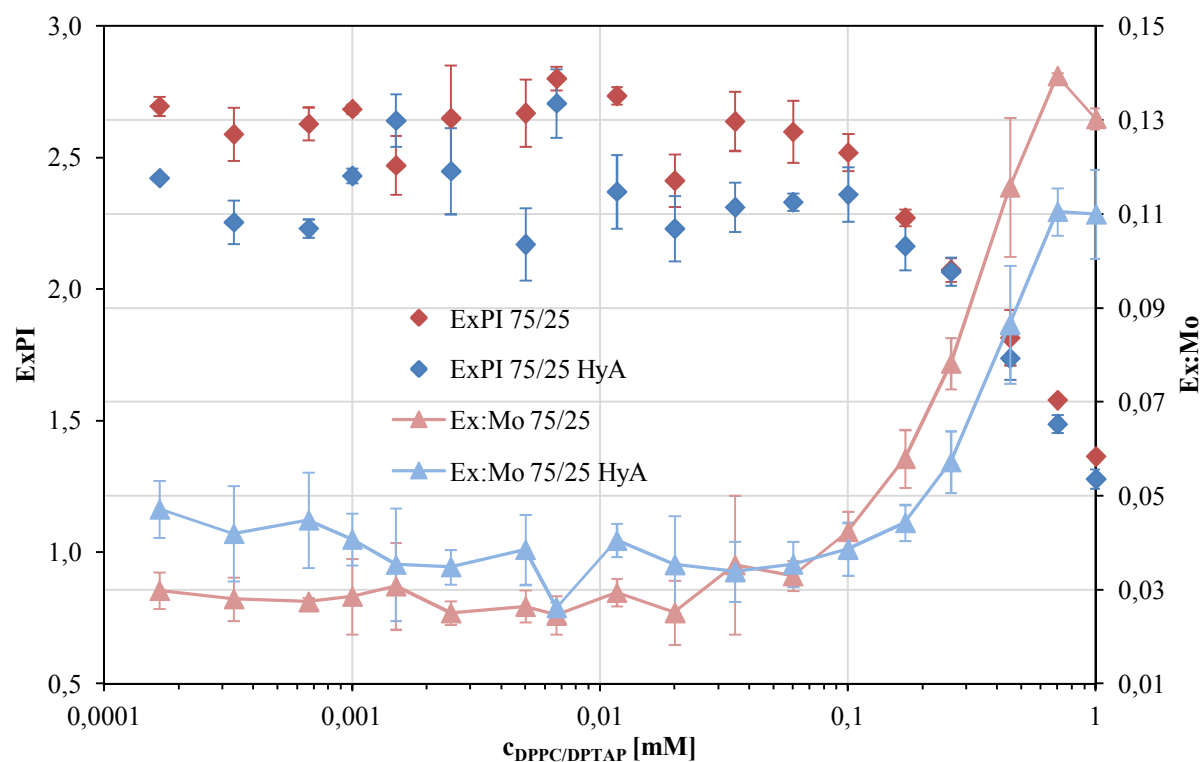


**Obrázek 20:** *EmPI v závislosti na koncentraci směsi lipidů DPPC/DPTAP po přidavku HyA*

**Obrázek 20** znázorňuje závislost EmPI na koncentraci lipidů po přidání HyA. Kromě směsi lipidů v poměru DPPC/DPTAP 90/10 nebyl u žádného systému naměřen druhý zlom, takže jejich CPA byla vypočítána pomocí prvního zlomu. Po přidání HyA k roztokům docházelo ke tvorbě sraženin na skle vialek, což pravděpodobně způsobilo chybové úsečky, které jsou v grafu vyznačeny. Jednotlivé hodnoty CPA jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

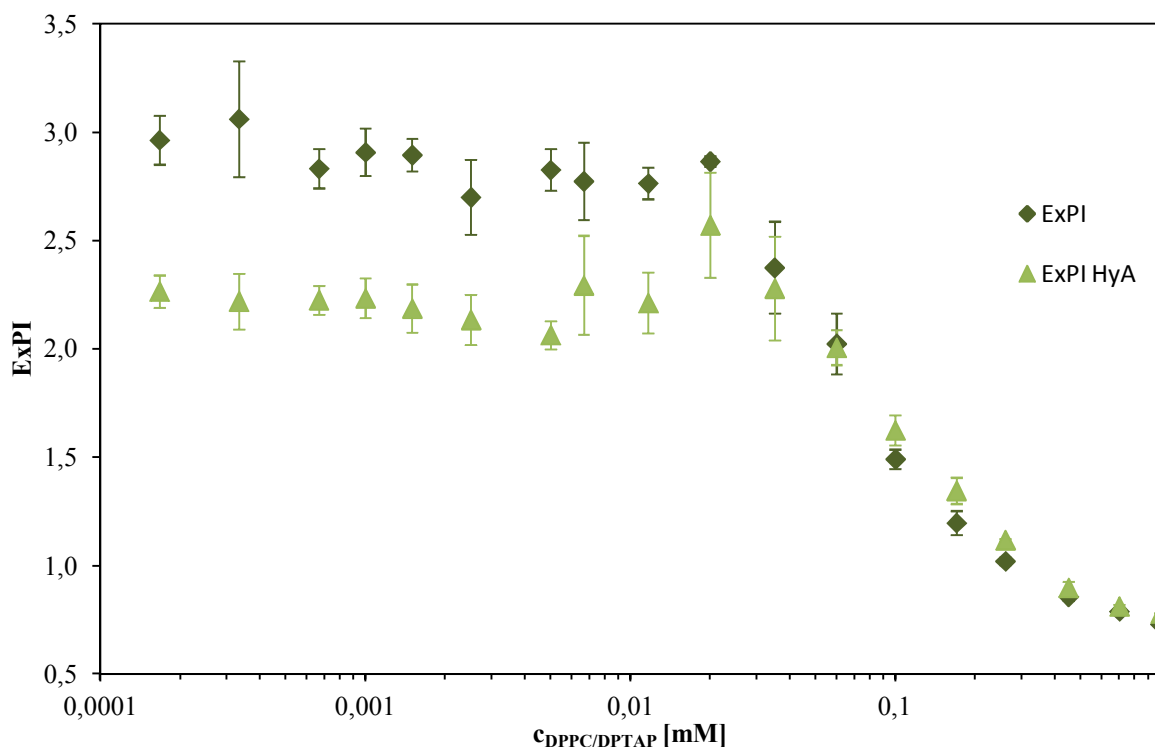
**Tabulka 2: Hodnoty CPA směsí DPPC a DPTAP po přidání HyA**

DPPC/DPTAP	CAC [ $\mu\text{M}$ ]	závislost	
		EmPI	ExPI
25/75	1. řada	102,9	161,9
	2. řada	98,8	221,9
	3. řada	92,9	166,0
	<b>průměr</b>	<b>98,2</b>	<b>183,3</b>
	odchylka	4,1	27,3
50/50	1. řada	105,2	292,6
	2. řada	100,3	155,4
	3. řada	132,1	177,2
	<b>průměr</b>	<b>112,5</b>	<b>208,4</b>
	odchylka	14,0	60,2
75/25	1. řada	52,4	98,4
	2. řada	59,1	111,1
	3. řada	65,9	91,4
	<b>průměr</b>	<b>59,1</b>	<b>110,3</b>
	odchylka	5,5	8,1
90/10	1. řada	18,1	66,3
	2. řada	13,3	55,7
	3. řada	16,5	41,5
	<b>průměr</b>	<b>15,9</b>	<b>54,4</b>
	odchylka	2,0	10,2



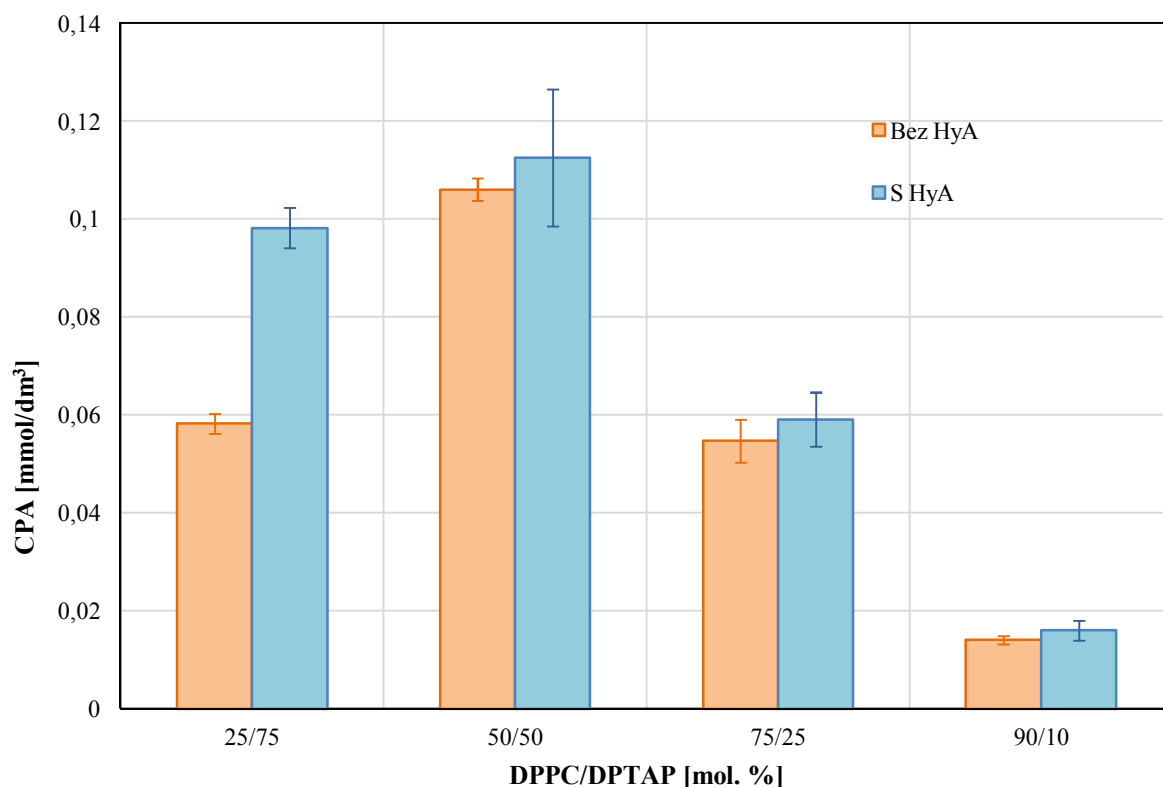
**Obrázek 21: Závislost ExPI a poměru Ex:Mo na koncentraci lipidů DPPC/DPTAP v poměru 75/25**

**Obrázek 21** znázorňuje závislost ExPI a poměru Ex:Mo na koncentraci lipidů DPPC/DPTAP v poměru 75/25. Už před přidání HyA jsou patrné změny hodnot ExPI jednotlivých vzorků v nízkých koncentracích (tyto změny nebyly v závislosti EmPI na koncentraci směsi lipidů zaznamenány). Tyto změny naznačují, že systém je při nízkých koncentracích málo stabilní. Na základě Troutier a kol. [29] by po vytvoření agregátů DPPC/DPTAP mohlo docházet ještě k interakcím mezi jednotlivými molekulami DPPC, které jsou ve směsi v nadbytku, což by vedlo ke vzniku více druhů agregátů. Dalším důvodem může být, že při nízkých koncentracích DPTAP v pufru dochází ke snížení odpudivých síly mezi jednotlivými kladně nabitými molekulami, díky čemuž pravděpodobně dochází ke vzniku agregátu ještě před CPA. V další práci bych doporučovala proměřit i velikosti vznikajících agregátů. Se zvyšující se koncentrací směsi se zvyšuje i stabilita. Po přidání HyA se tato vlastnost ještě umocní, což potvrzují i změny v průběhu Ex:Mo. Také lze pozorovat, že po přidání HyA dochází u systémů s nižší koncentrací lipidů ke snížení polaritu. Počátek agregace není přidáním HyA nijak výrazně ovlivněn, může to být způsobeno malou ochotou HyA interagovat s DPPC, který je ve směsi v nadbytku.



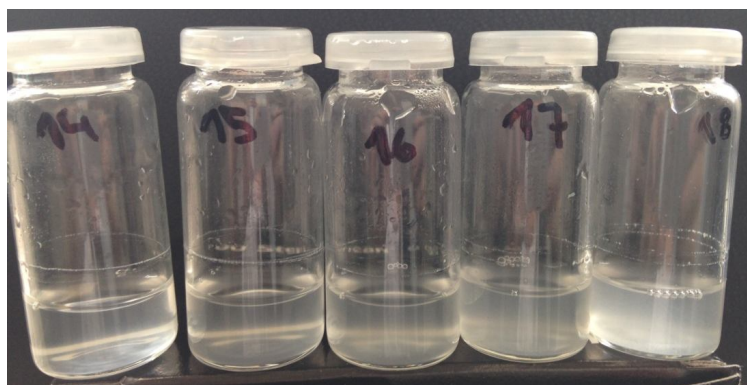
**Obrázek 22:** Závislost ExPI na koncentraci směsi lipidů DPPC/DPTAP v poměru 90/10

Na **Obrázku 22** je zobrazena závislost ExPI na koncentraci směsi lipidů DPPC/DPTAP v poměru 90/10. U čisté směsi jsou u některých vzorků s nízkou koncentrací směsi lipidů DPPC/DPTAP patrné poklesy hodnoty ExPI. Po přidání HyA docházelo v nízkých koncentracích k poklesu a opětovnému nárůstu hodnoty ExPI, čímž se vytvořil zlom v závislosti v oblasti koncentrací směsi DPPC a DPTAP (0,002 – 0,004 mM), ještě před počátkem agregace. Tento pokles naznačuje, že u nízkých koncentrací pravděpodobně dochází ke vzniku malých agregátů HyA se směsí DPPC/DPTAP. Stejně jako u poměru DPPC/DPTAP 75/25 nedochází přidáním HyA k výraznému ovlivnění počátku agregace.



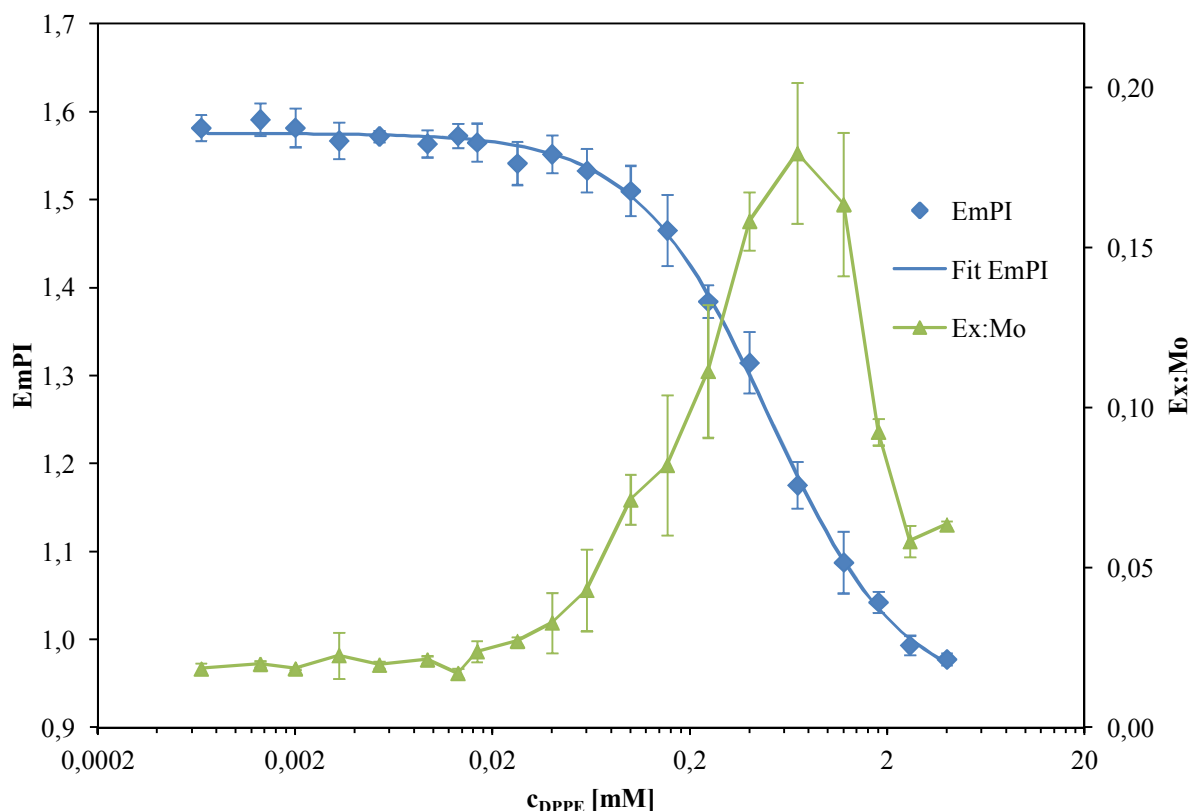
**Obrázek 23:** Hodnoty CPA EmPI pro jednotlivé poměry směsi DPPC/DPTAP

Na **Obrázku 23** je zobrazené porovnání CPA pro jednotlivé směsi DPPC/DPTAP. Po přidání HyA dochází k mírnému nárůstu CPA, který potvrzuje schopnost HyA ovlivnit směs lipidů. U poměru DPPC/DPTAP 25/75 dochází po přidání HyA k největším změnám, což může být způsobeno větší silou interakce mezi DPTAP a HyA nežli DPTAP a DPPC. To by potvrzoval i fakt, že při zvýšení poměru DPPC ve směsi, dochází po přidání HyA pouze k mírnému zvýšení CPA. Také je patrné, že největší chybové úsečky vznikají u směsi v poměru 50/50. Tato chyba byla pravděpodobně způsobena tvorbou sraženin v roztoku, které jsou zobrazeny na **Obrázku 24**. K ucelení výsledků byly využity poznatky o čistém DPTAP z diplomové práce Szewieczkové J. [30], kde je na **Obr. 24** viditelný posun počátku agregace k vyšším koncentracím DPTAP po přidání HyA.



**Obrázek 24:** Vzorčky směsi DPPC/DPTAP 50/50 po přidání HyA

### 5.3 Stanovení CAC DPPE a jeho směsi



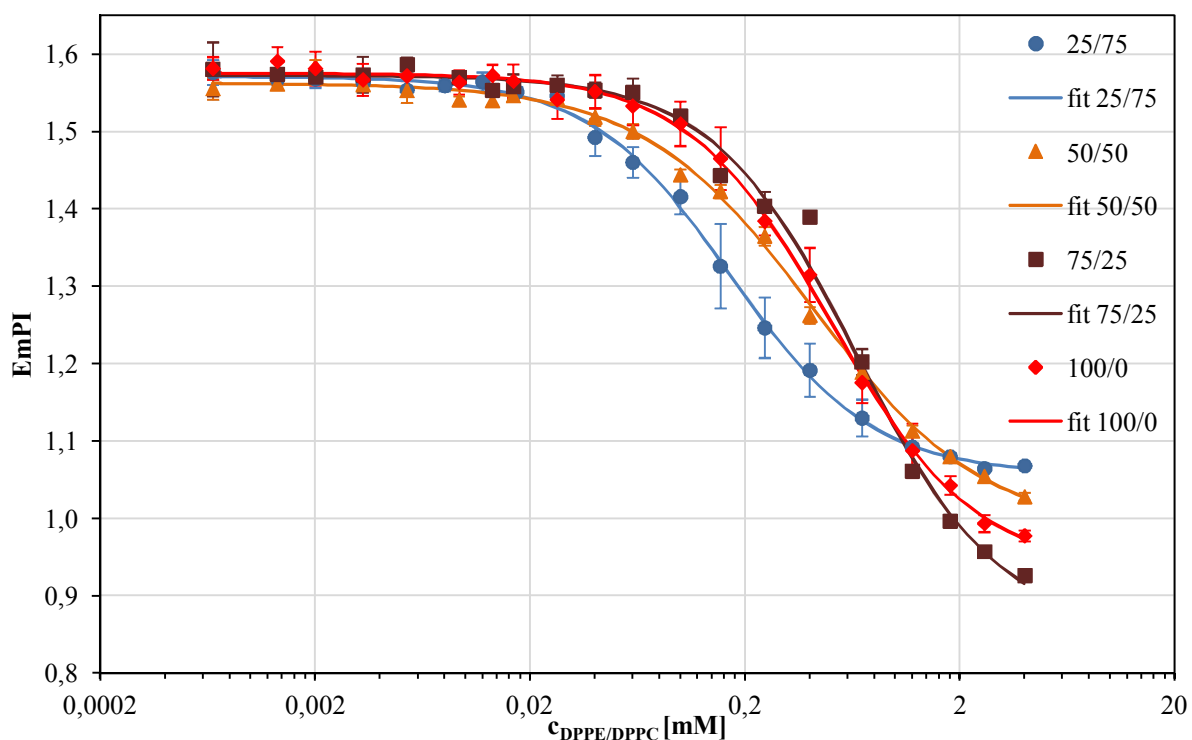
**Obrázek 25:** Závislost  $EmPI$  a poměru  $Ex:Mo$  na koncentraci DPPE

**Obrázek 25** vykresluje závislost  $EmPI$  a poměru  $Ex:Mo$  pyrenu na koncentraci DPPE. Na rozdíl od směsí DPPC s DPTAP, v případě DPPE a jeho směsí s DPPC byly zaznamenány kompletní sigmoidy, proto byla data proložena Boltzmannovou závislostí a hodnoty CAC byly získány jako koncentrace směsi lipidů v inflexním bodu. Znázornění závislosti  $Ex:Mo$  na koncentraci vykazuje nárůst v oblasti CAC. Při vyšších koncentracích jsou přítomné větší chybové úsečky, což je pravděpodobně způsobené vznikem sraženin.

Závislost  $ExPI$  pyrenu na koncentraci lipidu byla také proložena Boltzmannovou závislostí, ze které byla vypočítána hodnota CAC. Neměřené hodnoty CAC jsou uvedeny v **Tabulce 3**.

### 5.4 Interakce směsí DPPE a DPPC

Byly nachystány 3 řady o 20 vzorcích se vzrůstající koncentrací DPPE nebo jeho směsí s DPPC ve vodě. Směsi byly namíchány v poměrech 25/75, 50/50, 75/25 a byly postupně proměřeny jejich emisní a excitační polaritní indexy a také poměr  $Ex:Mo$ . Všechny takto změřené závislosti měli charakter Boltzmannovi S-křivky a díky této závislosti byla matematicky vyjádřena hodnota CAC.



**Obrázek 26:** Znáznornění závislosti  $EmPI$  na koncentraci směsi DPPE/DPPC v různých poměrech

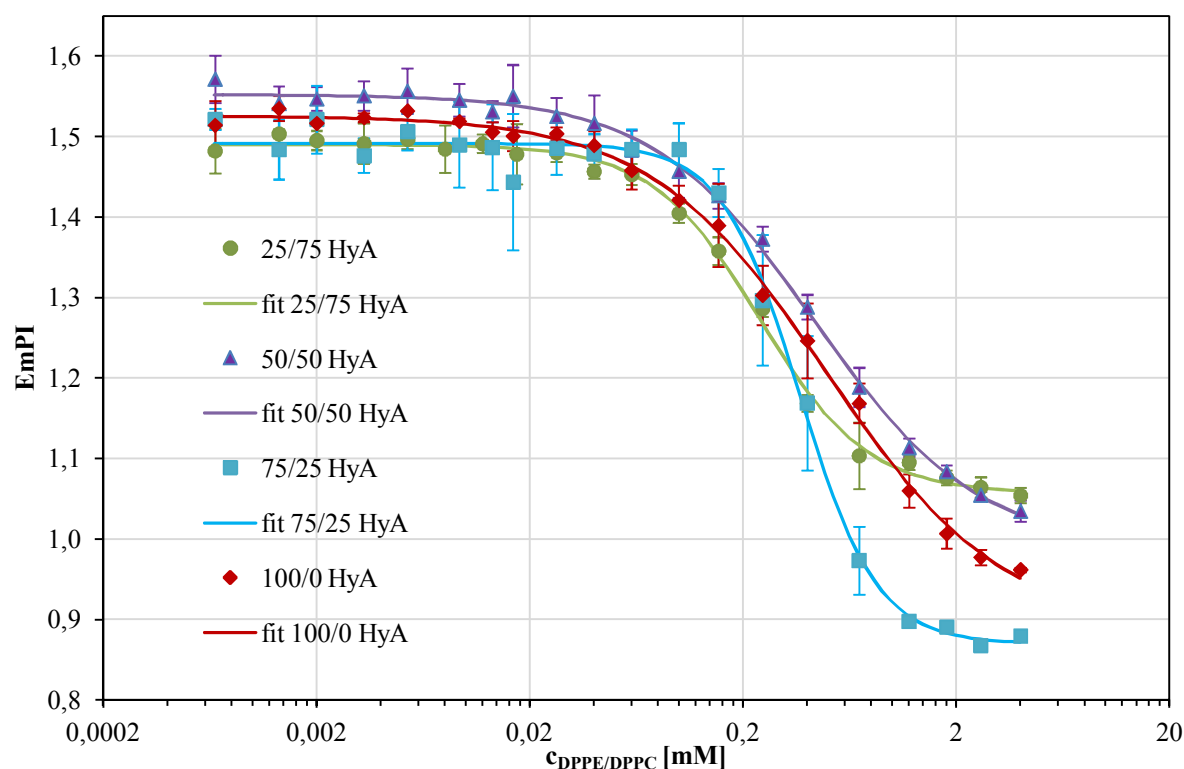
**Tabulka 3:** Hodnoty CAC pro DPPE a jeho směsi

DPPE/DPPC	CAC [ $\mu M$ ]	závislost	
		EmPI	ExPI
25/75	1. řada	151,1	174,3
	2. řada	159,8	210,7
	3. řada	-	-
	<b>průměr</b>	<b>155,4</b>	<b>192,5</b>
	odchylka	4,4	18,2
50/50	1. řada	453,9	509,1
	2. řada	465,5	516,1
	3. řada	373,9	401,4
	<b>průměr</b>	<b>431,1</b>	<b>524,9</b>
	odchylka	40,7	52,5
75/25	1. řada	696,5	764,7
	2. řada	721,9	696,7
	3. řada	712,1	712,4
	<b>průměr</b>	<b>710,2</b>	<b>724,6</b>
	odchylka	10,5	29,1
100/0	1. řada	510,6	764,8
	2. řada	484,9	743,2
	3. řada	442,9	644,6
	<b>průměr</b>	<b>479,5</b>	<b>717,5</b>
	odchylka	27,9	52,3

**Obrázek 26:** Znázornění závislosti EmPI na koncentraci **Obrázek 26** je vyobrazuje závislost EmPI pyrenu na koncentraci DPPE a jeho směsi s DPPC v poměrech 25/75, 50/50 a 75/25. Ze závislostí byly vypočítány hodnoty inflexních bodů, které odpovídají hodnotám CAC. Vypočítané hodnoty CAC jsou uvedeny v **Tabulce 3**. Stejným způsobem byly proloženy a vypočítány CAC pro závislost ExPI pyrenu na koncentraci DPPE a jeho směsi.

## 5.6 Studium interakcí DPPE a jeho směsí po předání HyA

Do roztoků byla po proměření jejich agregačního chování přidána HyA a všechny vzorky byly opět změřeny, aby se zjistili případné agregační změny.



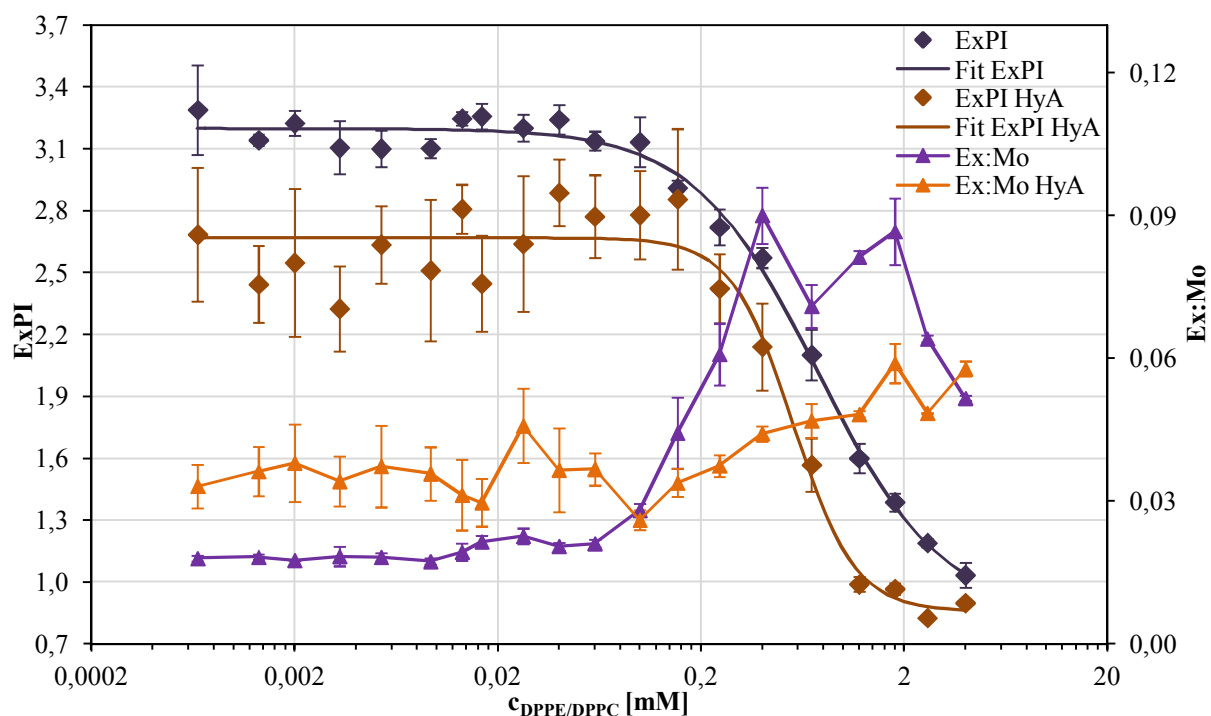
**Obrázek 27:** *EmPI v závislosti na koncentraci DPPE nebo jeho směsí DPPE/DPPC v různých poměrech po přidání HyA*

**Obrázek 27** znázorňuje závislosti EmPI pyrenu na koncentraci DPPE a jeho směsí po přidání HyA. Všechny závislosti byly proloženy Boltzmannovou. Stejným způsobem byly vypočítány přibližné hodnoty CAC pro závislost ExPI na koncentraci směsi DPPE/DPPC po přidání HyA. Vypočítané hodnoty CAC jsou uvedeny v **Tabulce 4**.



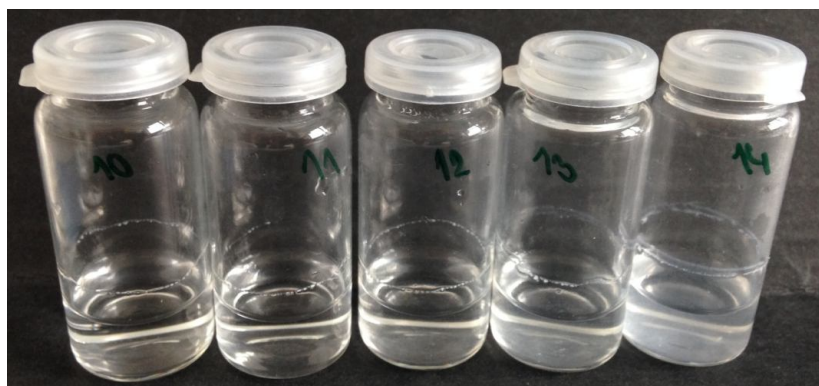
**Tabulka 4: Vypočítané CAC po přidání HyA**

DPPE/DPPC	CAC [ $\mu\text{M}$ ]	závislost	
		EmPI	ExPI
25/75	1. řada	277,1	430,5
	2. řada	221,1	404,3
	3. řada	233,1	448,9
	<b>průměr</b>	<b>243,8</b>	<b>427,9</b>
	odchylka	24,1	18,3
50/50	1. řada	449,6	353,5
	2. řada	448,9	662,9
	3. řada	420,2	627,3
	<b>průměr</b>	<b>439,6</b>	<b>547,9</b>
	odchylka	13,7	138,2
75/25	1. řada	445,6	625,1
	2. řada	334,6	506,9
	3. řada	317,2	574,5
	<b>průměr</b>	<b>365,8</b>	<b>568,8</b>
	odchylka	56,9	48,4
100/0	1. řada	576,2	676,5
	2. řada	473,9	502,7
	3. řada	497,6	652,9
	<b>průměr</b>	<b>515,9</b>	<b>610,7</b>
	odchylka	43,7	76,9

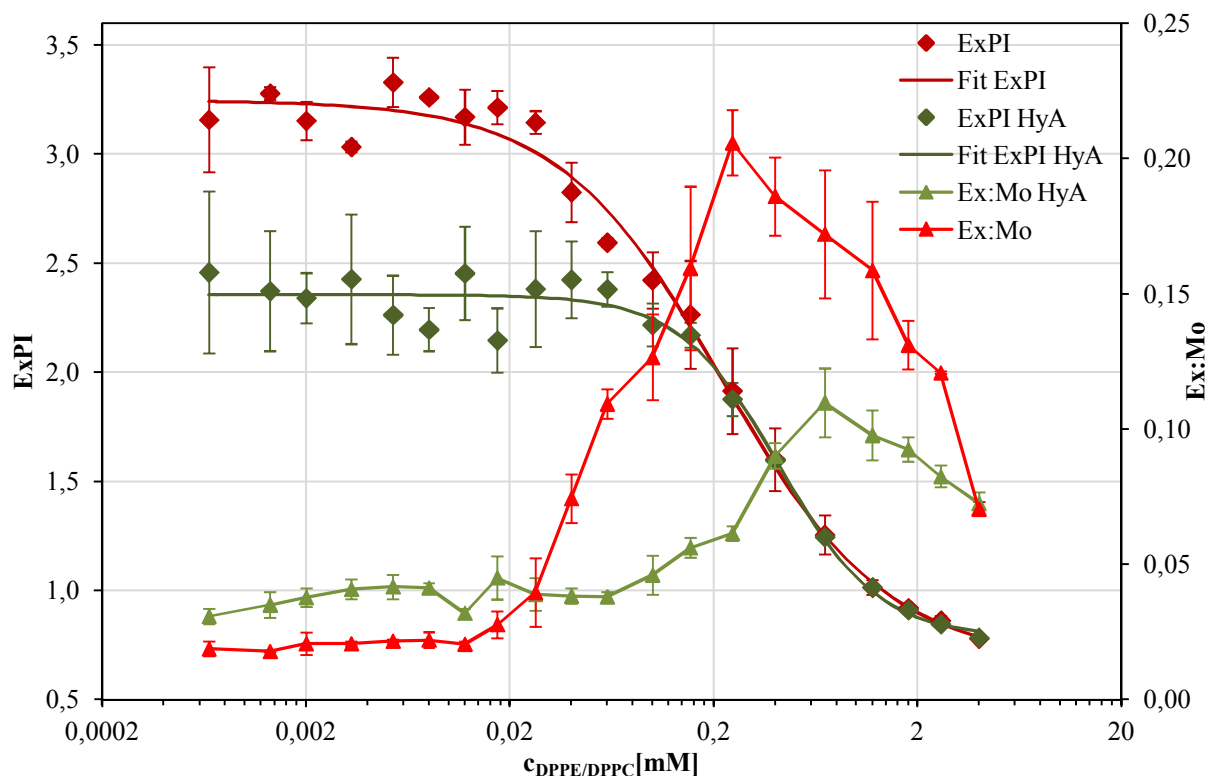


**Obrázek 28:** Závislosti ExPI a poměru Ex:Mo pyrenu na koncentraci směsi lipidů DPPE/DPPC v poměru 75/25

**Obrázek 28** srovnává závislost ExPI pyrenu na koncentraci směsi DPPE a DPPC ve vodě v poměru 75/25. Směs po přidání HyA vykazuje značné poklesy ExPI u některých vzorků v koncentracích výrazně před CAC. Tyto poklesy mohou naznačovat, že HyA začala interagovat se směsí ještě před dosažením CAC. Po přidání HyA také dochází k poklesu CAC, což je ovšem lépe patrné až z hodnot uvedených v **Tabulce 4**. Po přidavku HyA vznikaly u nižších koncentrací v průběhu měření velké směrodatné odchylky, které jsou v grafu vyznačeny. Tyto odchylky mohou být způsobeny vznikem sraženin, které jsou viditelné na **Obrázku 29**, sraženiny pravděpodobně vznikaly i u nižších koncentrací, kde ale nejsou na fotkách tak viditelné. **Obrázku 28** také vyobrazuje závislost Ex:Mo na koncentraci lipidů, pro stejný poměr. Tato závislost naznačuje zpočátku mírný růst, což potvrzuje interakci HyA s lipidem, ještě před dosažením CAC.



**Obrázek 29:** Vzorky směsi DPPE/DPPC 75/25 po přidání HyA

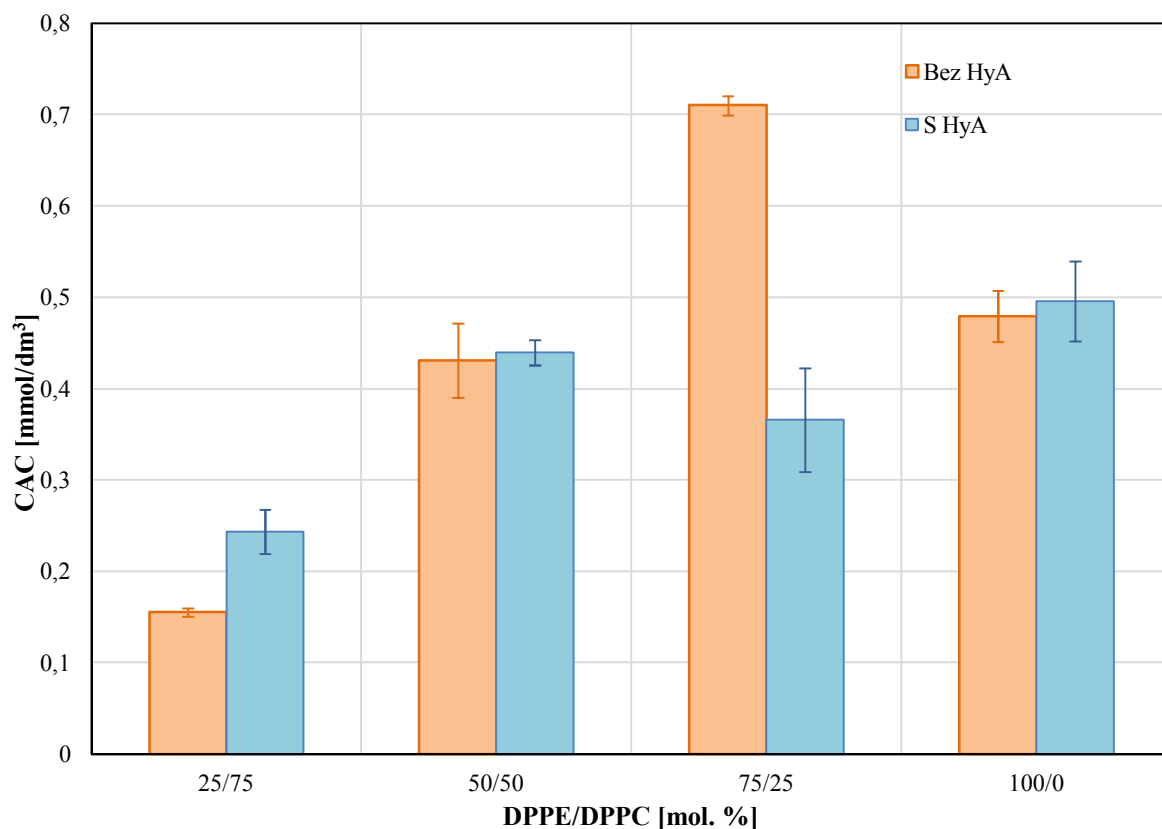


**Obrázek 30:** ExPI a poměr Ex:Mo pyrenu v závislosti na koncentraci směsi lipidů DPPE/DPPC v poměru 25/75

Podobné chování jako u předcházející směsi bylo zaznamenáno i na směsi lipidů DPPE a DPPC ve vodě v poměru 25/75. Byla proměřena závislost ExPI na koncentraci této směsi před a po přidání HyA. Z **Obrázku 30**: ExPI a poměr Ex:Mo pyrenu v závislosti na koncentraci směsi lipidů DPPE/DPPC v poměru 25/75 **Obrázku 30** je zřejmé, že i před přidání HyA dochází k interakcím, jelikož dochází k poklesu počátečních hodnot EmPI. Poměr Ex:Mo už v nízkých koncentracích vykazuje mírný vzrůst, hlavně po přidání HyA, což potvrzuje interakce HyA se směsí lipidů. Velké odchylky měření po přidání HyA byly pravděpodobně způsobeny vznikem sraženin, které jsou vidět na **Obrázku 31**. Z **Obrázku 30** je také patrný vzrůst CAC po přidání HyA. Naměřená data ve směsi bez HyA vykazuje odchylky, hlavně u vyšších koncentrací, ale nebyl zde vypořizován, žádný trend závislosti, což mohlo být způsobeno tím, že roztoky o vyšších koncentracích byly poměrně zakalené.



**Obrázek 31:** Směs DPPE/DPPC v poměru 25/75 po přidání HyA



**Obrázek 32:** Porovnání CAC pro jednotlivé směsi DPPE/DPPC

**Obrázek 32** dokazuje, že největší změny CAC směsi DPPE/DPPC po přidání HyA nastávaly v poměrech 25/75 a 75/25. Naopak, v případě čistého DPPE a směsi DPPE/DPPC v poměru 50/50 dochází pouze k mírnému ovlivnění směsí hyaluronanem.

Nárůst CAC po přidání hyaluronanu je patrný pouze v systému DPPE/DPPC 25/75, což bylo pravděpodobně způsobeno interakcemi mezi HyA a DPPC, které je v nadbytku. To by potvrdzovala i diplomová práce Maivaldové I., kde mimo jiné zkoumala interakce DPPC a HyA o různých molekulových hmotnostech a při přidání HyA o molekulové hmotnosti 300 kDa došlo k mírnému zvýšení koncentrace odpovídající počátku agregace [31]. U směsi v ekvimolárním poměru DPPE/DPPC bude pravděpodobně docházet k silnějším interakcím mezi molekulami DPPE a DPPC, vazby s vodou a HyA budou omezené, proto je ovlivnění přídavkem HyA tak nízké. Se zvyšující se koncentrací DPPE se zvyšuje jeho ochota interagovat s vodou a klesá jeho ochota tvořit intramolekulární vazby [32]. Při poměru DPPE/DPPC 75/25 bude docházet k interakcím s vodou a HyA přes vodíkové můstky, což by mělo za následek pokles CAC. U poměru DPPE/DPPC 100/0, je snaha interagovat s vodou největší, proto mohlo dojít k obsazení většiny vazebných míst vodou a po přidání HyA docházelo pouze k minimálnímu ovlivnění. Chybové úsečky, vyznačené v grafu vznikly pravděpodobně díky sraženinám, které se tvořily hlavně u roztoků s vyšší koncentrací. Také mohlo díky míře zakalení roztoků o vysoké koncentraci dojít k ovlivnění měření.

## 6. ZÁVĚR

Cílem práce byla řešena na téma interakce hyaluronan-biokompatibilní amfifilní látka a na jejím základu vybrat vhodné amfifilní látky pro experimentální část. Jako vhodné látky byly vybrány fosfolipidy: 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DPPC), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfoetanolamin (DPPE) a lipid postrádající fosfátovou skupinu 1,2-dipalmitoyl-3-trimetylamonium-propan (DPTAP). Interakce byly zkoumány pomocí fluorescenční spektroskopie. Jako fluorescenční sonda byl použit pyren.

Byly určeny počátky agregace směsi lipidů DPPC a DPTAP o různých poměrech v pufru. Dále se studovali jejich změny po přidání hyaluronanu. U této směsi se, kromě jediného poměru, nevyskytoval druhý zlom, takže nebylo možné prokládat data Boltzmannovou závislostí. Počátky agregace byly získány proložením závislostí dvěma přímkami. Měřením bylo zjištěno, že přidavek hyaluronanu k této směsi zvyšuje počátky agregace. Odchytky měření byly pravděpodobně způsobeny vznikem sraženin.

Také byly měřeny kritické agregační koncentrace DPPE a jeho směsi s DPPC v odlišných poměrech ve vodě. I přes zakalenost roztoků naměřené hodnoty vykazovali charakter sigmoidní Boltzmannovi křivky. Pomocí této závislosti byly vypočítány kritické agregační koncentrace směsi před a po přidání hyaluronanu. Bylo zjištěno, že přidavek hyaluronanu dochází ke změnám kritické agregační koncentrace. Kromě poměru DPPE/DPPC 75/25 došlo po přidavku hyaluronanu ke zvýšení CAC.

K dalšímu prostudování bych doporučila směs DPPC a DPTAP v poměru 75/25, kde byly zaznamenány rozdíly ExPI pyrenu i při nízkých koncentracích. Také směs DPPC a DPTAP v poměru 90/10, která jako jediná směs těchto lipidů vykazovala charakter Boltzmannovi závislosti. U směsi DPPE a DPPC bych k následnému měření doporučila směsi v poměru 75/25 a 25/75, které v nízkých koncentracích vykazovali různé posuny, což by mohlo naznačovat, že se dochází k tvorbě menších agregátů ještě před CAC.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] LINDMAN, Björn a Paschalis ALEXANDRIDIS. *Amphiphilic block copolymers: self-assembly and applications*. 1st ed. New York: Elsevier, 2000, xii, 435 p. ISBN 04-448-2441-3.
- [2] EIDELMAN, Ofer, Robert BLUMENTHAL a Anne WALTER. Composition of octyl glucoside-phosphatidylcholine mixed micelles. *Biochemistry*. 1988, vol. 27, issue 8, pp. 2839-2846. DOI: 10.1021/bi00408a027.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00408a027>
- [3] DILL, Ken A. Configurations of the amphiphilic molecules in micelles. *The Journal of Physical Chemistry*. 1982, vol. 86, issue 9, pp. 1498-1500. DOI: 10.1021/j100206a006.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100206a006>
- [4] INSTITUT GALENUS. *Amfifilní látky* [online]. 2015 [cit. 2015-05-05].  
Dostupné z: <http://galenus.cz/clanky/rejstrik/amfifilni-latky>
- [5] INFOVEK. *Fosfolipidy* [online]. 1999, 21.03.2003 [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: [http://www.infovek.sk/predmety/biologia/diplomky/biologia\\_bunky/fosfolipidy.htm](http://www.infovek.sk/predmety/biologia/diplomky/biologia_bunky/fosfolipidy.htm)
- [6] Lipid bilayer. *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2015-05-18]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid\\_bilayer#Fusion](http://en.wikipedia.org/wiki/Lipid_bilayer#Fusion)
- [7] THE AOCS LIPID LIBRARY. *Phosphatidylcholine and related lipids: structure, occurrence, biochemistry and analysis* [online]. Scotland: James Hutton Institute, 2012, 12.6.2012 [cit. 2015-05-03].  
Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pc/index.htm>
- [8] AOCS LIPID LIBRARY. *Phosphatidylethanolamine and related lipids: structure, occurrence, biochemistry and analysis* [online]. Scotland, 2014, 1.6.2014 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pe/index.htm>
- [9] BALAZS, Daniel A. a WT. GODBEY. Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery*. 2011, vol. 2011, pp. 1-12. DOI: 10.1155/2011/326497. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/326497/>
- [10] *Journal of applied cosmetology: Liposomes in dermatological preparations*. Řím: International Ediemme, 1990, vol. 8, no. 1. ISSN 0392-8543.
- [11] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry*. 2008, vol. 19, issue 5, pp. 697-717. DOI: 10.1007/s11224-008-9370-3.  
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11224-008-9370-3>
- [12] NEČAS, J., BARTOŠÍKOVÁ, L., BRAUNER, P., KOLÁR, J. *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*. *Vet. Med. (Prague)*, 2008, vol. 53, no. 8, p. 397-411.
- [13] GARG, Harry a Charles HALES. *Chemistry and biology of hyaluronan* [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2004, 605 s. [cit. 2015-05-04]. ISBN 00-804-4382-6.
- [14] ATKINS, E. D. T. a J. K. SHEEHAN. Structure for Hyaluronic Acid. *Nature New Biology*. 1972-2-23, vol. 235, issue 60, pp. 253-254. DOI: 10.1038/newbio235253a0.  
Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/newbio235253a0>

- [15] Hascall, V. C., Laurent, T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. 1997, poslední revize 15.12.1997 [citováno 2015-02-27]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.
- [16] Scott, J. E.: *Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution. Some biological consequences* [online]. Poslední revize 15.3.1998 [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>.
- [17] BROWN, MB a SA JONES. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005, vol. 19, issue 3, pp. 308-318. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>
- [18] KOVÁŘ, David. *Studium biointerakcí s využitím kombinace piezoelektrického a optického systému*. Brno, 2009, 66 l. diplomová práce.
- [19] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [20] NĚMCOVÁ, Irena. *Spektrometrické analytické metody I.: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997, 166 s. ISBN 80-718-4365-2
- [21] BAINS, Gursharan, Arti B. PATEL a Vasanthy NARAYANASWAMI. 2011. Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes. *Molecules* [online]. **16**(12): 7909-7935 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.3390/molecules16097909. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/9/7909/>
- [22] FORSEY, R, J FISHER, J THOMPSON, M STONE, C BELL a E INGHAM. *The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model*. *Biomaterials*. 2006, vol. 27, issue 26, pp. 4581-4590. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206003802>
- [23] WANG, Min, Chao LIU, Esben THORMANN a Andra DĚDINAITÉ. *Hyaluronan and Phospholipid Association in Biolubrication*. *Biomacromolecules*. 2013-12-09, vol. 14, issue 12, pp. 4198-4206. DOI: 10.1021/bm400947v. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400947v>
- [24] BRAY, BONNIE ANDERSON. The Role of Hyaluronan in the Pulmonary Alveolus. *Journal of Theoretical Biology* [online]. 2001, vol. 210, issue 1, pp. 121-130. DOI: 10.1006/jtbi.2001.2305. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519301923057>
- [25] ARPICCO, Silvia, Carlotta LERDA, Elisa DALLA POZZA, Chiara COSTANZO, Nicolas TSAPIS, Barbara STELLA, Massimo DONADELLI, Ilaria DANDO, Elias FATTAL, Luigi CATTEL a Marta PALMIERI. *Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine: an electron microscopy and rheometric study*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013, vol. 85, issue 3, pp. 373-380. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.06.003.



- Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S093964111300221X>
- [26] VAN DEN HOVEN, Jolanda M., Sophie R. VAN TOMME, Josbert M. METSELAAR, Bastiaan NUIJEN, Jos H. BEIJNEN a Gert STORM. *Liposomal Drug Formulations in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Molecular Pharmaceutics*. 2011, vol. 8, issue 4, pp. 1002–1015. DOI: 10.1021/mp2000742.  
Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp2000742>
- [27] PEER, D. Hyaluronan is a key component in cryoprotection and formulation of targeted unilamellar liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2003-05-02, vol. 1612, issue 1, pp. 76-82. DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00106-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273603001068>
- [28] GZYL-MALCHER, Barbara, Maria FILEK a Gerald BREZESINSKI. Mixed DPPC/DPTAP Monolayers at the Air/Water Interface: Influence of Indolilo-3-acetic Acid and Selenate Ions on the Monolayer Morphology. *Langmuir* [online]. 2011-09-06, vol. 27, issue 17, pp. 10886-10893 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1021/la201765u. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la201765u>
- [29] TROUTIER, Anne-Lise, Laurent VÉRON, Thierry DELAIR, Christian PICHOT a Catherine LADAVIÈRE. New Insights into Self-Organization of a Model Lipid Mixture and Quantification of Its Adsorption on Spherical Polymer Particles †. *Langmuir* [online]. 2005, vol. 21, issue 22, pp. 9901-9910 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1021/la050796l. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la050796l>
- [30] SZEWIECZKOVÁ, J. *Fosfolipidy jako základ biodegradabilních nosičových systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [31] MAIVALDOVÁ, I. *Interakce fosfolipidů s polyelektrolyty ve vodném prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.
- [32] LEEKUMJORN, Sukit a Amadeu K. SUM. 2006. Molecular Simulation Study of Structural and Dynamic Properties of Mixed DPPC/DPPE Bilayers. *Biophysical Journal* [online]. 90(11): 3951-3965 [cit. 2015-05-13]. DOI: 10.1529/biophysj.105.076596. ISSN 00063495.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349506725784>



## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-fosfocholin
DPPE	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycerol-3-fosfoetanolamin
DPTAP	dipalmitoyl trimetylamonium propan
HyA	hyaluronan
EmPI	emisní polaritní index
ExPI	excitační polaritní index
CPA	počátek agregace
CAC	kritická agregační koncentrace
$\mu\text{M}$	$\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
BAM	Brewsterova úhlová mikroskopie
GIXD	metoda plochého dopadu RTG záření